

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

“DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *EHRlichia*
***spp.* EN PROPIETARIOS DE CANINOS DOMÉSTICOS**
CON EHRlichIOSIS”

TESIS

MONOGRAFÍA TÉCNICA PARA OPTAR EL
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

AUTOR

Beatriz Lucia Gómez Muchotrigo

Lima-Perú
2014

Dedicatoria

A Dios gracias por darme todo lo que tengo y cuidar de los que amo.

A quienes me inspiran a ser mejor cada día, me enseñan con cada una de sus travesuras, ocurrencias, palabras, caricias, besos, peleas (jejeje) etc.... Richitard y Karlita este logro es por ustedes, los amo y amaré por el resto de mis días, son los amores de mi vida, espero verlos a ustedes también culminar grandes éxitos. Me siento orgullosa de los dos.

A mis padres a quienes quiero, Haydee mi pequeña Hantaro (jijijij) gracias infinitas porque en las buenas y en las malas siempre estarás ahí conmigo, apoyándome. Don Carlos, mi viejito bello gracias por dejarme tus enseñanzas, tus anécdotas, tus bellos recuerdos y el ejemplo de fortaleza para seguir adelante.

A Richard porque pese a todas nuestras diferencias siempre estuviste apoyándome y ayudándome con este logro. Gracias de corazón.

Mi hermanito Ángel por la paciencia y ayuda para conmigo, créeme que es difícil tener ese relajo (jajaja) te quiero.

Agradecimientos

En especial a la persona que me dio la oportunidad de pertenecer a la familia de Patología Clínica... Dra. Olga Li gracias por su tiempo, sus consejos y por darme el apoyo para poder culminar esta etapa en mi vida.

Lucho gracias por la paciencia, el tiempo y la ayuda desinteresada para conmigo,
gracias de todo corazón

Gracias al equipo de Patología Clínica: Manuel, Carlitos, Sra. Blanca por mostrarme siempre esa sonrisa y hacerme sentir en familia y en confianza con todos Uds.

A mis amigos de toda la vida Jeca, Angelica, juancho, juanito, pepe, desde lejitos la fuana y ya pues tu también Víctor (jajajaja broma amiguito) gracias por su amistad los quiero mucho.

A todos mis familiares y personas que me apoyaron e hicieron posible este logro...

Gracias

CONTENIDO

	Pág.
CONTENIDO	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE APENDICES	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Ehrlichiosis: Historia y distribución geográfica.	5
2.2. Ehrlichiosis en el Perú.	5
2.3. Características del agente patógeno.	6
2.3.1 Generalidades de los agentes rickettsiales.	6
2.3.2 Propiedades del género <i>Ehrlichia spp.</i>	7
2.4. Ehrlichiosis Humana	8
2.4.1 Cuadro Clínico.	9
2.4.2 Ciclo Biológico.	9
2.4.3 Vectores.	10
2.4.4 Hospedero Reservorio.	11
2.4.4.1 Los caninos domésticos como hospederos reservorios.	12
2.4.5 Transmisión por garrapatas de la ehrlichiosis humanas y animales.	13
2.5. Patogénesis.	16
2.5.1 Ingreso del agente e invasión celular.	16
2.5.1.1 La pared celular de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> carece de LPS y Péptidoglicanos.	17
2.5.1.2 Secuestro del colesterol del hospedero.	18
2.5.1.3 Internalización y creación del compartimento replicativo.	18
2.5.1.4 Subregulación de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).	21
2.5.1.5 Inhibición de la apoptosis en la célula hospedera.	21
2.5.1.6 EL sistema de dos componentes (TCS).	21

2.5.1.7 Activación de citoquinas.	22
2.5.2 Inmunología.	22
2.6. Diagnóstico de la enfermedad.	24
2.6.1 Diagnóstico clínico.	25
2.6.2 Diagnóstico laboratorio.	26
2.6.2.1 Examen hematológico.	26
2.6.2.1.1 Examen microscópico del agente etiológico.	27
2.6.2.2 Bioquímica sanguínea.	28
2.6.2.3 Uroanálisis.	29
2.6.2.4 Diagnóstico serológico.	29
2.6.2.4.1 Prueba de inmunofluorescencia indirecta.	30
2.6.2.4.2 Western Blot.	32
2.6.2.5 Diagnóstico molecular.	32
2.7. Tratamiento de la enfermedad.	33
2.8. Control y Prevención.	34
2.8.1 Control de garrapatas.	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Lugar y época de ejecución del estudio.	35
3.2. Materiales.	35
3.3. Métodos.	37
3.3.1 Individuos.	37
3.3.2 Criterios de inclusión.	38
3.4. Toma de muestra.	38
3.5. Procesamiento de las muestras.	39
3.5.1 Prueba serológica (Inmunofluorescencia indirecta)	39
3.5.1.1 Primera Reacción	40
3.5.1.2 Segunda Reacción	41
3.5.1.3 Lectura de placas	42
3.6. Análisis de datos.	43
IV. RESULTADOS	44
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	50
VII. RECOMENDACIONES	51
VIII. BIBLIOGRAFÍA	52
IX. APÉNDICE	64

RESUMEN

La Ehrlichiosis es una enfermedad zoonótica emergente transmitida a los humanos a través de la picadura de garrapatas infectadas, de gran importancia en países tropicales y sub-tropicales. En el presente estudio se determinó la seropositividad contra *Ehrlichia chaffeensis* en propietarios de perros con antecedentes de ehrlichiosis mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y su asociación con el sexo, edad, exposición a garrapatas y nivel de contacto con los perros mediante la prueba de Chi cuadrado. Se evaluaron 95 personas sin distinción de sexo, edad o condición socio económica cuyos perros tenían historia de ehrlichiosis reciente, los cuales llenaron un cuestionario con datos clínicos y epidemiológicos de importancia. El estudio se realizó entre Enero del 2009 y Diciembre del 2010. Los resultados del total de personas consideradas en el presente estudio indicaron que el 31.6% (30/95) presentaron anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis*. Las variables edad y exposición a garrapatas resultaron estadísticamente significantes ($p < 0.05$), frente a la seropositividad contra *Ehrlichia chaffeensis*. De los pacientes seropositivos, el 80% son personas menores de 40 años (24/30), mientras que el 20% son personas de 40 años a más (6/30). Asimismo, de los pacientes seropositivos el 93.3% estuvieron expuestos a garrapatas (28/30) mientras que el 6.7% no estuvieron expuestos (2/30). Estos hallazgos confirman la exposición a *Ehrlichia chaffeensis* en propietarios de perros con antecedentes de ehrlichiosis en Lima Metropolitana, evidenciando asociación de los resultados con los factores de riesgo evaluados, tales como edad y exposición a garrapatas.

Palabras clave: *Ehrlichia chaffeensis*, inmunofluorescencia indirecta, personas, garrapatas, perros.

ABSTRACT

Ehrlichiosis is an emerging zoonotic disease transmitted to humans through the bite of infected ticks, of great importance in tropical and sub-tropical countries. In the present study *Ehrlichia chaffeensis* seropositivity against owners of dogs with a history of ehrlichiosis with the indirect fluorescent antibody (IFA) and its association with sex, age, exposure to ticks and level of contact with dogs was determined by testing Chi square. 95 people were evaluated regardless of sex, age or socioeconomic whose dogs had a history of recent ehrlichiosis, which completed a questionnaire with clinical and epidemiological data of important condition. The study was conducted between January 2009 and December 2010. Results of all persons considered in the present study indicated that 31.6% (30/95) had antibodies against *Ehrlichia chaffeensis*. The variables age and exposure to ticks were statistically significant ($p < 0.05$) versus the *Ehrlichia chaffeensis* seropositivity. Seropositive patients, 80% are under 40 years old (24/30), while 20% are people over 40 years (6/30). Also positive patients 93.3% were exposed to ticks (28/30) while 6.7% were not exposed (2/30). These findings confirm the exposure to *Ehrlichia chaffeensis* owners of dogs with a history of ehrlichiosis in Lima Metropolitan, showing association of the results with the evaluated factors such as age and tick exposure risk.

Keywords: *Ehrlichia chaffeensis*, indirect immunofluorescence, persons, ticks, dogs.

LISTA DE CUADROS

CUADRO N° 1.

Resultados de inmunofluorescencia indirecta (IFI) contra *E. chaffeensis*. **Pág. 44**

CUADRO N° 2.

Resultados de inmunofluorescencia indirecta (IFI) seropositiva contra *E. chaffeensis* clasificados según sexo. **Pág. 44**

CUADRO N° 3.

Resultados de inmunofluorescencia indirecta (IFI) seropositiva contra *E. chaffeensis* clasificados según edad. **Pág. 45**

CUADRO N° 4.

Resultados de inmunofluorescencia indirecta (IFI) seropositiva contra *E. chaffeensis* clasificados según exposición a garrapatas. **Pág.45**

LISTA DE FIGURAS

FIGURA N° 1.

Número de casos de EMH reportados al CDC en los EE.UU. entre los años 1994 – 2010. (Tomado de: CDC, 2013).

Pág. 4

FIGURA N° 2.

Áreas seropositivas contra *Ehrlichia chaffeensis* reportadas en el estudio de Moro *et al.*, 2009.

Pág. 6

FIGURA N° 3.

Ciclo biológico de *Ehrlichia chaffeensis*. (Tomado de: Paddock y Childs, 2003a)

Pág. 10

FIGURA N° 4

Macho adulto (a) y hembra adulta (b) de *Amblyomma americanum*, transmisores de la EMH en los EE.UU. (Tomado de: Holderman y Kaufman, 2013).

Pág. 11

FIGURA N° 5

Ejemplar juvenil macho de Venado Cola Blanca (*Odocoileus virginianus sub.peruvianus*) (Tomado de: Lovera *et al.*, 2011).

Pág. 12

FIGURA N° 6

Hembra adulta de *Amblyomma americanum* alimentándose en hospedero humano. (Tomado de: Holderman y Kaufman, 2013)

Pág. 14

FIGURA N° 7

Modelo de ingreso y replicación de *Ehrlichia chaffeensis* en célula huésped. (Tomado de: Rikihisa, 2010).

Pág. 16

FIGURA N° 8

Mecanismo de ingreso celular de *Ehrlichia chaffeensis* mediante caveolas. (Tomado de: Rikihisa, 2010).

Pág. 19

FIGURA N°9

“Rash” observado en la infección por *Ehrlichia chaffeensis*. (Tomado de: CDC, 2013).

Pág. 26

FIGURA N° 10

Aspirado de Médula Ósea de un paciente con EMH. Mórula de *Ehrlichia chaffeensis* en monocito.
(Tomado de: Barenfanger, 1997).

Pág. 28

FIGURA N° 11

Kit comercial utilizado para inmunofluorescencia indirecta (IFI). (Tomado de: Fuller Laboratories, 2014).

Pág. 30

FIGURA N° 12

Resultado positivo de IFI para *Ehrlichia chaffeensis*. Nótese la fluorescencia en monocitos DH82 (color rojo). (Tomado de: Fuller Laboratories).

Pág. 31

FIGURA N° 13

Preparación de las diluciones de los sueros (1:50) con PBS + leche descremada al 3%.

Pág. 39

FIGURA N° 14

Adición de 10ul. de suero sanguíneo por cada pocillo (10) de lectura.

Pág. 40

FIGURA N° 15

Adición de 10ul. de conjugado Anti-IgG-FITC humano en las placas.

Pág. 41

FIGURA N° 16

Adición del medio de montaje (PBS pH. 9.0 + glicerol) y colocación de los cubreobjetos a las placas.

Pág. 41

FIGURA N° 17

Lectura de placas de *Ehrlichia chaffeensis* en microscopio de epifluorescencia.

Pág. 42

FIGURA N° 18

Resultado positivo por inmunofluorescencia indirecta (IFI) contra *Ehrlichia chaffeensis*, dilución (1:50) – 400X.

Pág. 46

FIGURA N° 19

Resultado negativo por inmunofluorescencia indirecta (IFI) contra *Ehrlichia chaffeensis*, dilución (1:50) – 400X.

Pág. 46

LISTA DE ANEXOS

APÉNDICE N° 1.

Resultados de Chi cuadrado según sexo. **Pág. 64**

APÉNDICE N° 2.

Resultados de Chi cuadrado según la edad. **Pág. 64**

APÉNDICE N° 3.

Resultados de Chi cuadrado según exposición a garrapatas. **Pág. 64**

APÉNDICE N° 4.

Resultados de Chi cuadrado según contacto con perros. **Pág. 64**

APÉNDICE N° 5.

Distribución etárea de las personas seropositivas a Ehrlichiosis **Pág. 65**

I. INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis es una enfermedad infecciosa producida por bacterias Gram-negativas intracelulares obligadas, pleomórficas con frecuencia esféricas u ovoides (López *et al.*, 2003), pertenecientes al Orden Rickettsiales, Familia *Anaplasmataceae* y Géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* (Dumler *et al.*, 2001), que infectan leucocitos (Dumler *et al.*, 1993) y plaquetas (Tami *et al.*, 2003), entre los que destacan seis especies que causan infecciones en humanos, *Ehrlichia chaffeensis* agente responsable de la Ehrlichiosis Monocítica Humana (EMH), *Anaplasma phagocytophilum* causante de la Anaplasmosis Granulocítica Humana (AGH), así mismo, se ha detectado pacientes infectados con *E. ewingii*, *E. canis*, *E. equi* y *Neorickettsia sennetsu* (Chen *et al.*, 1994; Dumler *et al.*, 2007).

La ehrlichiosis es una enfermedad zoonótica emergente transmitida a los humanos a través de la picadura de garrapatas infectadas (Dumler *et al.*, 1995; Bojersson, 2000), de gran importancia en países tropicales y sub-tropicales (Greene, 1997). La mayoría de pacientes con ehrlichiosis presentan fiebre, dolor de cabeza, mialgias y el salpullido es visto en menos del 50% de los pacientes (López *et al.*, 2003) y desarrollan leucopenia, trombocitopenia, anemia y elevaciones en las transferasas hepáticas séricas (Dumler *et al.*, 1993).

La primera infección ehrlichial humana reconocida como “Fiebre del Sennetsu”, se describió en Japón en 1954. En 1986, el estudio de las ehrlichiosis humanas sufrió un espectacular avance debido a la descripción del primer caso de EMH en los EEUU, en un paciente con sintomatología compatible con Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (Maeda *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1991).

Hay evidencias serológicas de ehrlichiosis humana en Argentina (Ripoll *et al.*, 1999), Chile (López *et al.*, 2003), Venezuela (De Moraes *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2006) y Brasil (Da Costa, 2006). La mayor incidencia de estas infecciones se produce en los meses en los que las diferentes especies de garrapatas implicadas en la transmisión de estas bacterias están más activas (primavera-verano y principio de otoño) (Blanco *et al.*, 2002). En Chile y Argentina se

identificaron anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* por primera vez en humanos en el año 1999 (López *et al.*, 1999; Ripoll *et al.*, 1999), encontrándose prevalencias de 11.8% y 14% respectivamente, mientras que en Brasil se identificaron anticuerpos contra esta bacteria en un estudio publicado por Costa (2004).

Recientemente, se ha publicado un estudio en personas que realizan actividades veterinarias (médicos veterinarios, técnicos de laboratorio, bañadores de perros, etc.) en Lima Metropolitana, en el que se ha identificado por serología (IFI) anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* (24.6%) y *Ehrlichia canis* (29.2%) (Paulino *et al.*, 2013). Además, en el año 2009, Moro y colaboradores encontraron seroprevalencias para *E. chaffeensis* del 25%, 23%, 3 % y 3% en los departamentos de Piura, Cuzco, Lima e Iquitos, respectivamente. Por otro lado, el Instituto Nacional de Salud (INS) encontró una seroprevalencia de *E. chaffeensis* de 9.2% en el departamento de Ancash (Anaya *et al.*, 2009).

El presente estudio tuvo por objetivo determinar la seropositividad contra *Ehrlichia chaffeensis* en propietarios de perros con ehrlichiosis, debido a la exposición de estos individuos con animales que padecen y/o padecieron ehrlichiosis. Del mismo modo, se buscó determinar la asociación estadística entre las variables sexo, edad, procedencia y nivel de contacto con garrapatas frente a la seropositividad.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EHRLICHIOSIS: HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

La ehrlichiosis engloba a diversas enfermedades sistémicas provocadas por múltiples microorganismos del *Orden Rickettsiales*, que poseen características estructurales similares a las bacterias gramnegativas, siendo transmitidas por garrapatas (Parnell., 2004). La ehrlichiosis es una enfermedad causada por bacterias intracelulares estrictas, gram-negativas, pertenecientes al orden Rickettsiales, familia *Anaplasmataceae* y género *Ehrlichia* (Dumler *et al.*, 2001).

El primer agente ehrlichial fue observado en Argelia por Donatien y Lestoquard en 1935, quienes identificaron un microorganismo rickettsial en monocitos de caninos que cursaban con una enfermedad que ocasionaba pancitopenia severa, el cual fue denominado *Rickettsia canis* (Sainz *et al.*, 2000), para luego ser renombrado en 1945 como *Ehrlichia canis* (*E. canis*) en honor al bacteriólogo Paul Ehrlich (López *et al.*, 2003).

Históricamente, fue en 1953 cuando se identificó la primera especie de ehrlichia capaz de producir enfermedad en humanos; concretamente, fue en Japón y se trataba de *Ehrlichia sennetsu*, actualmente *Neorickettsia sennetsu* (Misao y Kobayashi, 1955).

En 1978, fue identificada por primera vez en Estados Unidos la *Ehrlichia platys*, actualmente denominada *Anaplasma platys* (*A. platys*) (Dumler *et al.*, 2001) y posteriormente se ha señalado en otros países americanos y europeos (Ettinger, 1992; Neer, 2000; Sainz *et al.*, 2000). Esta especie ha sido identificada además en Japón, Tailandia, Europa, Taiwán, Grecia, Israel y Venezuela (Dumler *et al.*, 2001).

En 1986, el estudio de las ehrlichiosis humanas sufrió un espectacular avance debido a la descripción del primer caso de EMH en los EE.UU., en un paciente con sintomatología compatible con Fiebre de las Montañas Rocosas (Figura 1). Este paciente fue negativo

serológicamente a *Rickettsia rickettsii* y dos semanas antes había estado en Arkansas expuesto a picaduras de garrapatas (Maeda *et al*, 1987). Si bien inicialmente se pensaba que el agente causal de esta nueva ehrlichiosis era *E. canis*, en 1990 Dawson y colaboradores, consiguieron aislar al agente etiológico de esta enfermedad de un paciente con sintomatología leve en Fuerte Chaffee (Dawson *et al*, 1991). El agente fue caracterizado a través de análisis de secuencia del gen 16S rRNA y se denominó *Ehrlichia chaffeensis* (Anderson, 1991).

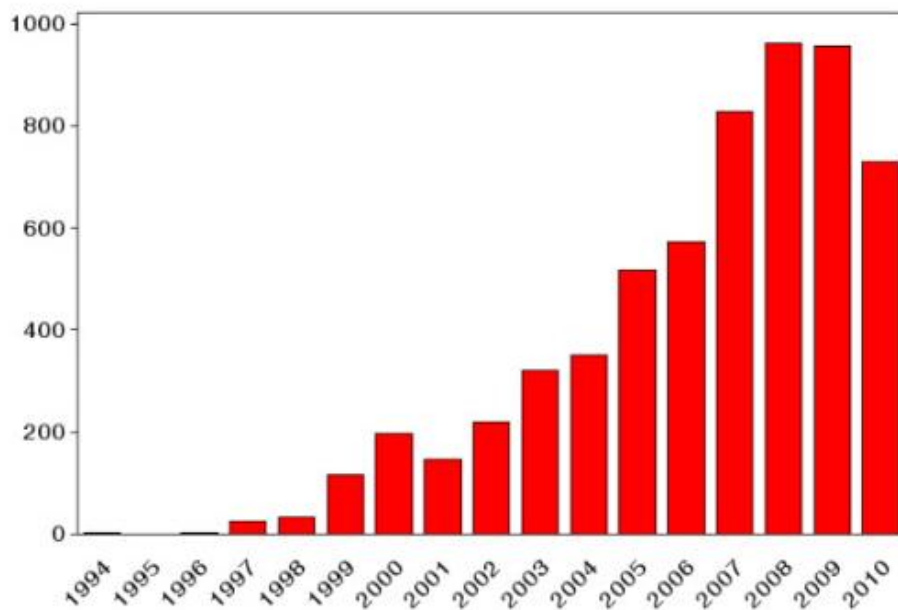


Figura 1.- Número de casos de EMH reportados al CDC en los EE.UU. entre los años 1994 – 2010.

(Tomado de: CDC, 2013)

Se han diagnosticado serológicamente casos de EMH en Portugal (Morais *et al*, 1991), Mali (Uhaa *et al*, 1992), Bélgica (Rikihisa, 1999). Sin embargo, el principal vector de la enfermedad es una especie americana de garrapata (*Amblyomma americanum*), por lo que algunos autores consideran que realmente no se ha documentado ningún caso de ehrlichiosis humana por *E. chaffeensis* fuera de Estados Unidos (Brouqui y Dumler, 2000).

La EMH es causada por la *Ehrlichia chaffeensis* (*E. chaffeensis*) (Paddock y Childs, 2003) y la EGH es provocada por un agente similar o idéntico a la *Ehrlichia equi* (*E. equi*), causante de Ehrlichiosis Granulocítica Equina (EGE) y a la *Ehrlichia phagocytophilum* (*E. phagocytophilum*), que produce la enfermedad en bovinos y ovinos (López *et al.*, 2003). Este agente se distribuye actualmente en Estados Unidos, Europa, África, Centro y Sudamérica

(Dumler *et al.*, 2001). Investigaciones recientes indican que el agente causante de la EGH, *E. equi* y *E. phagocytophilum* son una misma especie, denominándola actualmente como *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*) (Dumler *et al.*, 2001).

Los principales agentes infecciosos identificados en diversos países de América del Sur son *Ehrlichia canis* (Barros *et al.*, 2005; Vinasco *et al.*, 2007), *Ehrlichia chaffeensis* (López *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2006), *Anaplasma platys* (Abarca *et al.*, 2007) y *Anaplasma marginale*; los cuales se han observado en caninos (excepto *Anaplasma marginale*), por lo que se sugiere que los perros pueden actuar como reservorios de los agentes de la ehrlichiosis humana, lo que ha sido señalado por diferentes autores (Dawson *et al.*, 1996; Breitschwerdt *et al.*, 1998; López *et al.*, 2003).

2.2 EHRlichiosis EN EL PERU.

El primer agente reportado en Perú del género *Ehrlichia*, fue *Ehrlichia canis*, causante de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) (Chavera *et al.*, 1982), que actualmente tiene un gran impacto en nuestro país (Vinasco *et al.*, 2007), llegando a tener en caninos seroprevalencias de 16.5% (Adrianzén *et al.*, 2003) en Lima, hasta 76% en Sullana - Piura (San Miguel, 2006). En los últimos años en nuestro país, existen varios reportes de ehrlichiosis humana. En el año 2013, en Lima Metropolitana, se realizó un estudio en el que se detectó mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), que personas que realizaban actividades veterinarias (médicos veterinarios, enfermeros, asistentes, bañadores y técnicos de laboratorio), resultaron seropositivas contra *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis* en un 20.1% y 26.1%, respectivamente (Paulino *et al.*, 2013).

Además en el año 2009, Moro y colaboradores encontraron seroprevalencias para *E. chaffeensis* de 25%, 23%, 3% y 3% en los departamentos de Piura, Cuzco, Lima e Iquitos, respectivamente (Figura 2). Las seroprevalencias en mujeres y hombres fueron 15% (16 /106) y 9% (5/53), respectivamente (Moro *et al.*, 2009). Por otro lado, el Instituto Nacional de Salud (INS) encontró una seroprevalencia para *E. chaffeensis* de 9.2% en el departamento de Ancash (Anaya *et al.*, 2009).



Figura 2.- Áreas seropositivas contra *Ehrlichia chaffeensis* reportadas en el estudio de Moro *et al.*, 2009.

2.3 CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE PATÓGENO.

Las rickettsias precisan de células vivas para desarrollarse, por ello desde hace muchos años existía la controversia acerca de la clasificación correcta de los microorganismos rickettsiales, siendo colocados como un grupo intermedio entre las bacterias y los virus. Actualmente las rickettsias son consideradas bacterias, debido a que se conoce que poseen simultáneamente ADN y ARN, se dividen por fisión binaria, su pared es típica de las bacterias gramnegativas, son sensibles a agentes antimicrobianos y tienen una dotación enzimática propia que, aunque escasa, desarrolla funciones múltiples (Carter, 1985).

2.3.1 GENERALIDADES DE LOS AGENTES RICTECTSIALES

Los agentes rickettsiales pertenecen al Filum *Proteobacteria*, clasificadas como alfa proteobacterias gramnegativas. Estos microorganismos se presentan en formas bacilares, cocoides o pleomórficas. Las formas bacilares son cortas, mientras que las cocoides se presentan aisladas, en pares, cadenas cortas o en filamentos (Brooks *et al.*, 1999). Estas bacterias tienden a ser muy

pequeñas, teniendo un diámetro de 0.3 a 0.5 μm . y una longitud de 0.8 a 2.0 μm . (Prescott *et al.*, 1999).

Todos los microorganismos *Rickettsiales* son parásitos o mutualistas. Las formas parásitas crecen en diversos tipos celulares (eritrocitos de vertebrados, células retículo-endoteliales y células del endotelio vascular), habitando a menudo en artrópodos que se alimentan de sangre, como pulgas, garrapatas, ácaros o piojos, que actúan como vectores o como huéspedes primarios (Prescott *et al.*, 1999).

2.3.2 PROPIEDADES DEL GÉNERO *Ehrlichia* sp.

Todos los miembros de la familia *Anaplasmataceae* son bacterias intracelulares obligadas que se replican en el interior de una vacuola intracitoplasmática derivada de la membrana externa de la célula eucariota hospedadora. Son organismos de cocoides a elipsoides, a menudo pleomórficos, pequeños y gram-negativos que residen en vacuolas citoplásmicas, formando inclusiones únicas o, más habitualmente compactas (mórulas) (Ristic y Huxsoll, 1984; Dumler *et al.*, 2001). Ultraestructuralmente existen dos morfologías: grandes células reticuladas y formas más pequeñas de protoplasma condensado denominadas en inglés *dense-core forms* (Popov *et al.*, 1998).

Los miembros del género *Ehrlichia* no parecen contener cantidades significativas de péptidoglicanos. Ambos tipos celulares han sido demostrados en muestras clínicas, aunque la importancia microbiológica de éstas distintas formas morfológicas es desconocida. Las mórulas van desde 1.0 a 6.0 μm de ancho y contienen desde 1 hasta más de 40 organismos de tipos celulares uniformes o mixtos. El espacio intramorular puede contener una matriz fina, estriada fibrilar y túbulos intramorulares de 25 nm de diámetro y de un poco más de 1.5 μm , que se originan de la membrana externa de las células reticulares. En los cultivos celulares y células humanas infectadas, las mitocondrias de las células hospederas frecuentemente se unen a los márgenes de las mórulas (Paddock *et al.*, 2003). Presentan tropismo por células sanguíneas (leucocitos y plaquetas) de animales y humanos, e invaden su citoplasma, alojándose dentro de vacuolas, donde se multiplican por fisión binaria, dando origen a un agregado bacteriano o microcolonia, que por su apariencia se ha denominado "mórula" (Tami *et al.*, 2003).

Dentro del ciclo biológico general de las especies ehrlichiales se pueden distinguir dos formas típicas dentro del fagosoma. Los *cuerpos elementales* (CE), que tienen un diámetro de 0.5 – 0.9 μm . Se dividen por fisión binaria para dar lugar a los *cuerpos reticulares* (CR) de 1.5 – 2.5 μm , los cuales son similares a los cuerpos vistos en el género *Chlamidia* spp. (Popov *et al.*, 1998). Éstos

a su vez se dividen produciendo las típicas mórulas (formadas incluso por más de 40 cuerpos elementales) que pueden llegar a tener un tamaño de 4 – 5 μm (Sainz *et al.*, 2000).

El cuerpo elemental, debido a su diminuto tamaño, es difícil de visualizar en el citoplasma de la célula al observar el frotis sanguíneo coloreado con Wright, no así la forma madura o mórula, que por su tamaño es fácilmente identificada con el microscopio de luz (Tami *et al.*, 2002).

Rikihisa, (1996) clasificó las formaciones o inclusiones ehrlichiales de la siguiente manera:

- *Inclusiones pequeñas* (0.2 – 0.4 μm): Denominadas también, “formas densas” similares a los cuerpos elementales (CE) clamidiales.
- *Inclusiones relativamente largas* (0.8 – 1.5 μm): Denominadas también “formas ligeras”, similares a los cuerpos reticulares (CR) que son observadas en especies muy patógenas del género *Ehrlichia spp.*

2.4 EHRlichiosis HUMANA.

La EMH es una enfermedad emergente transmitida por garrapatas, que fue reconocida por primera vez en humanos en 1987. Las infecciones humanas son causadas por 6 especies distintas: la *Ehrlichia chaffeensis* agente responsable de la EMH, el *Anaplasma phagocytophilum* causante de la Anaplasmosis Granulocítica Humana (AGH), así mismo, se ha detectado pacientes infectados con *E. ewingii*, *E. canis*, *E. equi* y *Neorickettsia sennetsu* (Moro *et al.*, 2009). La primera infección ehrlichial humana reconocida como “Fiebre del Sennetsu”, se describió en Japón en 1954 (Anderson, 1991).

Las serovigilancias y las técnicas moleculares han documentado la presencia de ehrlichiosis en humanos en América del Sur (Moro *et al.*, 2009). Hay evidencias serológicas de esta enfermedad en Argentina, Brasil, Chile y Venezuela, hasta la actualidad, no se han identificado las especies de garrapatas que actúan como vectores de la ehrlichiosis en estos países (Anaya *et al.*, 2009).

En 1994, en Venezuela, el primer reporte de infección por *Ehrlichia* en humanos fue publicado por Tamí y colaboradores. En este trabajo preliminar, se identificó el microorganismo por visualización de mórulas en el interior de plaquetas de humanos y caninos (Tamí *et al.*, 1994).

En (1999), publicaron la comprobación por técnicas de PCR que la *E. ewingii* infectaba a seres humanos, provocando signos clínicos agudos muy difícil de diferenciarlos de los provocados por *E. chaffeensis* o *A. phagocytophilum* (Buller *et al.*, 1999). En el año 1993, fue identificada en EE.UU., caracterizada por invadir el citoplasma de los granulocitos, por lo que se la designó como *Ehrlichia granulocítica humana*, y a la enfermedad que produjo se le denominó “ Ehrlichiosis Granulocítica Humana” (Tami y Jordán, 2002).

2.4.1 CUADRO CLÍNICO.

El cuadro clínico de la ehrlichiosis humana es muy inespecífico y se caracteriza por fiebre, malestar general, cefalea, mialgias, náuseas y anorexia. Posteriormente, aparecen cuadros de linfadenopatía y en un 30% de los casos se describen erupciones cutáneas y sintomatología digestiva. También se pueden observar cuadros neurológicos y respiratorios según la gravedad del proceso (Bakken y Dumler, 2000). A nivel laboratorial se observa trombocitopenia, leucopenia y anemia (Bakken *et al.*, 1996).

Independientemente de la especie causante de la ehrlichiosis, el cuadro clínico puede variar de asintomático a fatal. Sin embargo, se debe reconocer que la EMH causada por *E. chaffeensis* es la más grave (Maeda *et al.*, 1987; Paddock y Childs, 2003). Esta enfermedad se ha asociado con el síndrome de dificultad respiratoria grave en adultos y meningoencefalitis (incluso en pacientes inmunocompetentes), sabiendo que en pacientes con la inmunidad comprometida, esta enfermedad es mucho más grave, incluso mortal (Paddock y Childs, 2003). *E. ewingii* ha sido asociada con la enfermedad principalmente en personas inmunodeprimidas (Buller *et al.*, 1999). Mientras que la Anaplasmosis Granulocítica Humana (AGH) producida por *A. phagocytophilum*, suele causar una enfermedad más leve (Tami y Jordán, 2002).

En resumen, se ha podido constatar la infección en humanos con, al menos, 5 especies diferentes pertenecientes a 3 géneros de la Familia Anaplasmataceae: *Anaplasma phagocytophilum*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. canis* y *Neorickettsia sennetsu* (Buller *et al.*, 1999; Olano *et al.*, 2003).

2.4.2 CICLO BIOLÓGICO.

Las larvas *no infectadas* al alimentarse de sangre de un reservorio vertebrado infectado (venado de cola blanca), adquieren la bacteria, la cual permanece viable en los artrópodos mientras mudan al estadio de ninfa (Figura 3).

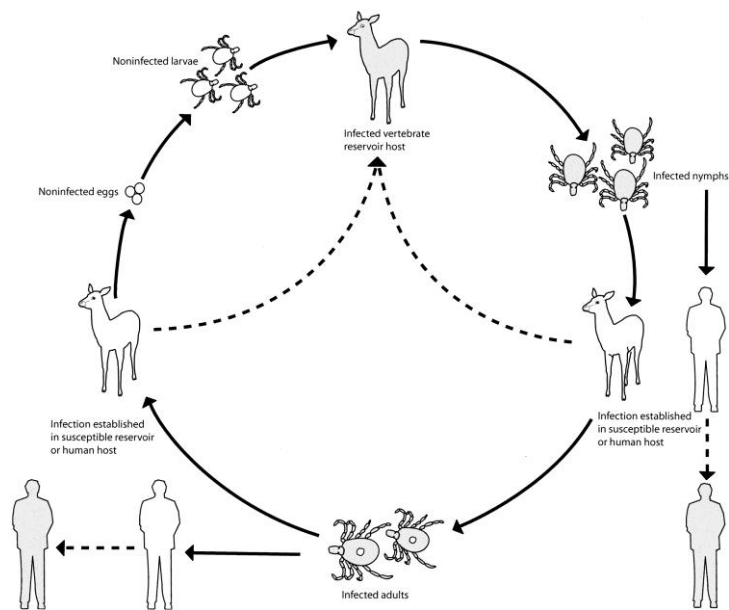


Figura 3.- Ciclo biológico de *Ehrlichia chaffeensis*.

(Tomado de: Paddock y Childs, 2003a)

Seguidamente, las ninfas infectadas pueden transmitir *E. chaffeensis* a reservorios susceptibles o a humanos durante su alimentación con sangre. Posteriormente, las ninfas infectadas mudan al estadio adulto, manteniendo a la bacteria con capacidad infectiva. Por lo tanto, las garrapatas poseen la capacidad de la *transmisión transestadial* posterior al proceso de alimentación de hospederos infectados (Paddock y Childs, 2003a).

2.4.3 VECTORES

Ehrlichia spp. es transmitida por garrapatas duras de la familia *Ixodidae*. *Amblyomma americanum* o la garrapata de la estrella solitaria (Figura 4) es el vector transmisor de EMH en Norte América (Paddock y Childs, 2003a). Ésta se encuentra distribuida predominantemente en los estados del sur de Estados Unidos de América (Paddock y Childs, 2003b).

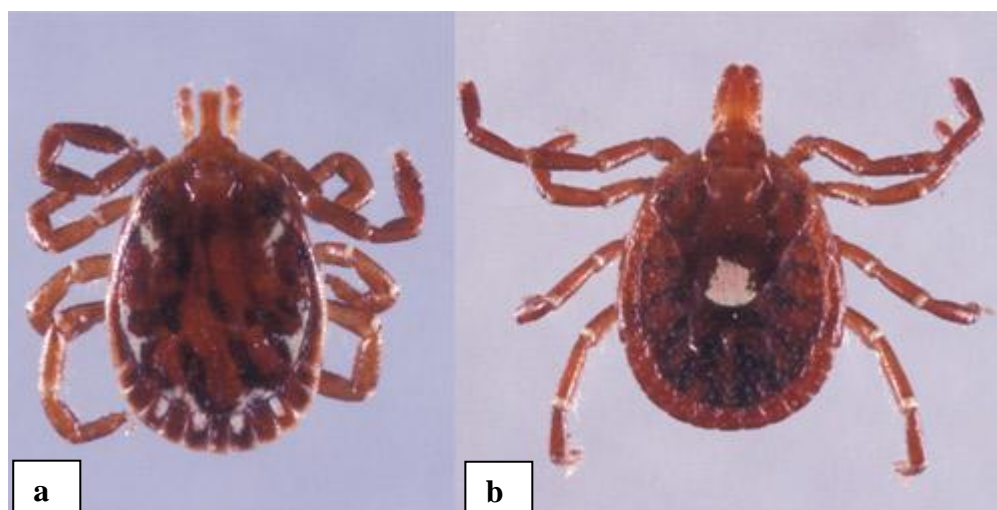


Figura 4.- Macho adulto (a) y hembra adulta (b) de *Amblyomma americanum*, transmisores de la EMH en los EE.UU.

(Tomado de: Holderman y Kaufman, 2013).

Se ha aislado a *E. chaffeensis* de otras garrapatas incluyendo a *Rhipicephalus sanguineus* en Camerún (Ndip *et al*, 2009), *Dermacentor variabilis* (Roland *et al*, 1998; Kramer *et al*, 1999) e *Ixodes pacificus* (Kramer *et al*, 1999) en el sur de Estados Unidos de América, *Ixodes ricinus* en Rusia (Alekseev *et al*, 2001), *Amblyomma testidinarium* y *Haemaphysalis yeni* en China (Cao *et al*, 2000) *Amblyomma parvum* en Argentina (Tomassone, 2008) e *Ixodes ovatus* en Japón (Shibata *et al*, 2000).

2.4.4 HOSPEDEROS RESERVORIOS

El venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) representa a la única especie vertebrada reconocida como hospedero completo (Figura 5) y suficiente para mantener el ciclo de transmisión de *E. chaffeensis* (Paddock y Childs, 2003a), debido a que esta especie es la fuente más importante de sangre para las garrapatas adultas y estadíos juveniles de *A. americanum* (Goddard y Varela-Stokes, 2008). Pero se ha aislado a la bacteria de muchas otras especies, incluyendo a cabras domésticas (Dugan *et al*, 2000), caninos domésticos (Breitschwerdt, 1998; Frank y Breitschwerdt, 1999; Zhang *et al*, 2003), coyotes (Kocan *et al*, 2000), zorros rojos (Davidson *et al*, 1999), mapaches (Comer *et al*, 2000), zarigüeyas (Lockhart *et al*, 1998) y aves migratorias (Alekseev *et al*, 2001).



Figura 5.- Ejemplar juvenil macho de Venado Cola Blanca (*Odocoileus virginianus subsp. peruvianus*)

(Tomado de: Lovera *et al.*, 2011).

2.4.4.1 LOS CANINOS DOMÉSTICOS COMO HOSPEDEROS RESERVORIOS

Los perros son potencialmente los reservorios más importantes para todos los patógenos zoonóticos que afectan humanos debido a su gran número en nuestro país y el mundo, a su estilo de vida libre que les da acceso a lugares infestados con garrapatas y a su proximidad con los humanos. Los caninos domésticos pueden servir como vehículo de transporte a las garrapatas para llegar a nuestras casas (Paddock y Childs, 2003a).

Como se indicó anteriormente, Ndip y colaboradores en el 2009 aislaron ADN del agente causante de EMH de la garrapata parda del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) en Camerún y en 1998 Liberato, encontró una prevalencia de $11.75\% \pm 9.2$ de *R. sanguineus* en caninos de los distritos de San Juan de Miraflores, Villa María del Triunfo y Villa el Salvador de la provincia de Lima. Esta garrapata podría ser la probable responsable de la transmisión de la enfermedad, pero no es definitivo hasta que haya un aislamiento y secuenciación de la bacteria en las garrapatas pardas de nuestro país.

2.4.5 TRANSMISIÓN POR GARRAPATAS DE LAS EHRlichiosis HUMANAS Y ANIMALES

Como ya ha sido señalado, la ehrlichiosis o enfermedad ehrlichial comprende las enfermedades producidas en animales superiores por agentes infecciosos pertenecientes a los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia*. La transmisión de estos agentes se produce a través de agentes vectores, garrapatas en el caso de *Ehrlichia* y *Anaplasma* y nemátodos y tremátodos en el caso de *Neorickettsia*. Las garrapatas son parásitos externos pertenecientes taxonómicamente al suborden *Metastigmata*, orden *Parasitiformes*, subclase *Acari*, clase *Arachnida*, subphylum *Chelicerata*, phylum *Artropoda*. Existen dos familias: *Ixodidae* o garrapatas duras y *Argasidae* o garrapatas blandas (Cupp, 1991).

Las garrapatas son uno de los principales grupos de artrópodos que afectan la salud animal, ejerciendo una acción patógena directa, derivada de su efecto mecánico y tóxico, y una acción patógena indirecta, derivada de su capacidad de vehiculizar agentes patógenos.

Cuando las garrapatas vehiculizan agentes patógenos con potencial zoonótico, la salud humana también se encuentra involucrada. Se considera que las garrapatas están sólo por detrás de los mosquitos como vectores de enfermedades humanas en el mundo. Uno de los principales grupos de agentes patógenos, de conocido potencial zoonótico, de los que las garrapatas son vectores son los agentes ehrlichiales. Siendo las garrapatas de la familia *Ixodiade* las principalmente relacionadas con la transmisión de estas enfermedades (Kidd y Breitschwerdt, 2003).

Las garrapatas se encuentran distribuidas mundialmente aunque existe una distribución geográfica particular para cada una de las especies, a su vez cada especie de garrapata es vector de diferentes agentes patógenos. La existencia de las enfermedades transmitidas por garrapatas en un área geográfica está condicionada a la existencia de la garrapata vector. La identificación de las especies de garrapatas es un factor importante en la detección y diagnóstico de las enfermedades transmitidas por garrapatas y es un prerrequisito para su control y posible erradicación (Cupp, 1991).

Rhipicephalus sanguineus o garrapata marrón del perro se encuentra distribuida mundialmente, es vector entre otros agentes de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*, por ello la Ehrlichiosis canina es una enfermedad de distribución mundial. Las garrapatas vectores de *Ehrlichia ruminantium* pertenecen a diversas especies de *Amblyoma* que sólo se encuentran en África, de ahí que la enfermedad del corazón de agua de los rumiantes se encuentre limitada a ese

área geográfica. *Ehrlichia ewingii* y *E. chaffeensis* son transmitidas por *A. americanum*, garrapata originaria del continente americano. *Ixodes ricinus* es la garrapata vector de *Anaplasma phagocytophilum* distribuida tanto en el continente americano como el europeo (Cupp, 1991).

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados, cada uno de sus estadios evolutivos necesitan sangre como fuente nutritiva y en los adultos es necesaria para la producción de esperma y huevos (Cupp, 1991). Las garrapatas presentan cuatro estados evolutivos en su ciclo vital: huevo, larva hexápoda, ninfa octópoda y adulto, las dos últimas son las más importantes como vectores de enfermedad (Kidd y Breitschwerdt, 2003). La transformación entre un estado evolutivo y otro requiere de una o más mudas y puede necesitar de uno, dos o más huéspedes, esto tiene su importancia a la hora de su función como vector de enfermedades.

Las garrapatas inciden la piel del hospedador con el par de quelíceros y posteriormente insertan el hipostoma en la herida y lo hacen penetrar en la piel hasta llegar a los capilares sanguíneos que laceran produciendo un pequeño hematoma desde el que se alimentan (Cupp, 1991). El anclaje de la garrapata al hospedador depende de sus partes bucales, éstas son más o menos grandes dependiendo de la especie, en general las garrapatas con partes bucales más pequeñas producen una sustancia cementante que ancla estrechamente la garrapata al hospedador. Las garrapatas inyectan secreciones salivares que contienen sustancias que ayudan a penetrar en la piel del huésped además de alterar localmente la hemostasia y producir una reacción inflamatoria local que facilita la nutrición de la garrapata desde la lesión producida (Figura 6).



Figura 6.- Hembra adulta de *Amblyomma americanum* alimentándose en hospedero humano.

(Tomado de: Holderman y Kaufman, 2013)

Algunas garrapatas pueden inocular componentes tóxicos como el responsable de la parálisis flácida. También es a través de la saliva como las garrapatas inoculan agentes patógenos al hospedador. La acción quimiotáctica de las secreciones salivares, atrae a la zona células inflamatorias factibles de ser infectadas por los patógenos inoculados, y puede producir una inmunosupresión local que facilitaría el establecimiento de los patógenos transmitidos en el hospedador (Kopecky *et al*, 1999).

La garrapata ingresa los patógenos en su organismo al alimentarse de un hospedador infectado, éstos llegan al epitelio intestinal y penetran en la cavidad corporal de la garrapata (el hemocele) acompañados del agua y de los iones en exceso que son aprovechados por las glándulas salivares para formar la saliva que será de nuevo inoculada, en ese o en otro hospedador, permitiendo la transmisión de los agentes infecciosos ingeridos con la comida. Existe una transmisión transtadial de los patógenos vehiculizados por las garrapatas, de tal manera que una infección adquirida en el estadio de ninfa se mantendrá hasta el adulto, pudiendo infectar a más de un huésped a lo largo de su desarrollo (Cupp, 1991). La transmisión transovárica, desde la garrapata hembra a su prole, no parece jugar un papel importante en la transmisión natural de las enfermedades ehrlichiales. Así, mientras Donatien y Lestoquard en 1937 indicaban la existencia de transmisión transtadial y transovárica de *E. canis* en *R. sanguineus*, estudios posteriores demuestran que la transmisión es exclusivamente transtadial (Groves *et al*, 1975).

Los géneros de garrapatas de la familia Ixodidae de mayor importancia médica, por su capacidad de transmisión de patógenos, son: *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Ixodes*, *Boophilus*, *Amblyomma* y *Haemaphysalis*. El espectro de hospedadores suele ser amplio, no estando limitado a un hospedador específico, aunque suelen existir preferencias. Esta característica y la transmisión transtadial de patógenos, determinan la posibilidad de transmisión de la enfermedad entre distintas especies (Hoskins, 1991).

Las garrapatas son longevas y son capaces de mantenerse vivas, sin alimentarse, por períodos prolongados en cualquiera de sus estadios de desarrollo. En general el desarrollo de las garrapatas viene favorecido por climas cálidos, ya que no son capaces de soportar condiciones extremas de frío o humedad, sin embargo pueden buscar protección en casas, madrigueras, perreras, etc., pudiendo sobrevivir en climas fríos (Kidd y Breitschwerdt, 2003).

La longevidad de las garrapatas, su potencial reproductivo y la posible transmisión transovárica de algunos patógenos hace que las garrapatas no sólo puedan actuar como vectores de enfermedades, sino también como reservorios de patógenos (Cupp, 1991).

2.5 PATOGÉNESIS

La patogénesis de EMC incluye un período de incubación de 8 a 20 días, seguido de una fase aguda, subclínica y a veces crónica. Durante la fase aguda, el parásito ingresa al torrente sanguíneo y linfático y se localiza en los macrófagos del sistema retículo-endotelial del bazo, hígado y ganglios linfáticos, donde se replica por fisión binaria. Desde allí, las células mononucleares infectadas, diseminan a las rickettsias hacia otros órganos del cuerpo (Harrus *et al.*, 1999).

2.5.1 INGRESO DEL AGENTE E INVASIÓN CELULAR

Una vez transmitida a los humanos, *E. chaffeensis* tiene la extraordinaria habilidad para tomar a las células inmunes de defensas de primera línea como sus sitios exclusivos de supervivencia. Las células más infectadas son los monocitos pero también se han observado en linfocitos, linfocitos atípicos, promielocitos, metamielocitos, neutrófilos abastondados y segmentados (Paddock y Childs, 2003). Estas bacterias luego se replican en las inclusiones unidas a la membrana en el citoplasma del hospedero formando las mórulas. La célula infectada contiene típicamente 1 a 2 mórulas (Figura 7) pero se pueden encontrar hasta 15 en pacientes inmunosuprimidos (Paddock y Childs, 2003; Rikihisa, 2003).

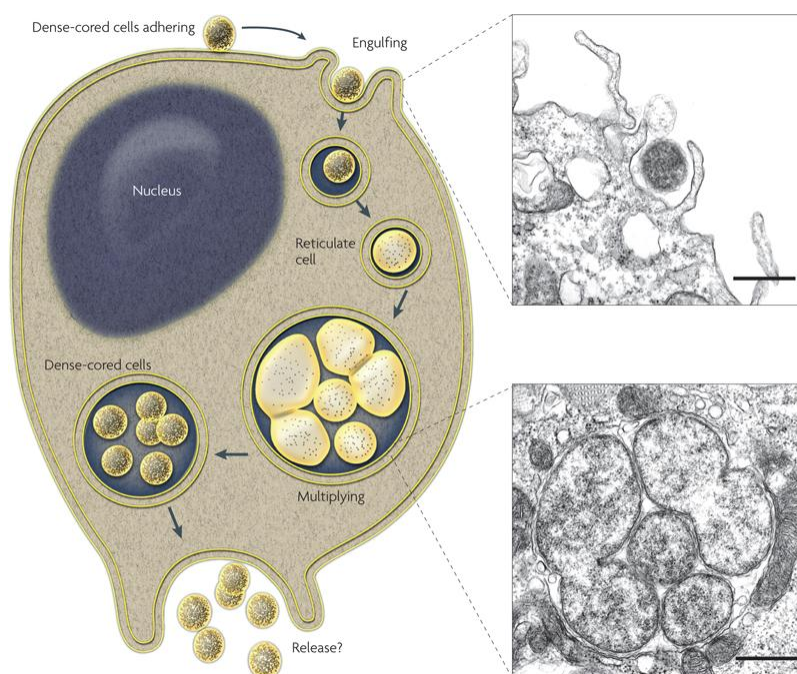


Figura 7.- Modelo de ingreso y replicación de *Ehrlichia chaffeensis* en célula huésped.
(Tomado de: Rikihisa, 2010).

Los monocitos y macrófagos son células equipadas con poderosas defensas antimicrobiales innatas (Rikihisa *et al*, 2003). Además poseen receptores de superficie (TLRs) que reconocen patrones en las bacterias (PAMPs), que a su vez activan al sistema inmune para eliminar a los microorganismos invasores. Entonces, la duda es cómo es que *E. chaffeensis* puede introducirse y proliferar en las células blancas o de defensa. Los mecanismos no son completamente entendidos, pero sí se sabe que hay diversas características que ha desarrollado esta bacteria para poder pasar desapercibida en el organismo del hospedero hasta poder proliferar y luego instalarse (Rikihisa *et al*, 2003).

2.5.1.1 LA PARED CELULAR DE *Ehrlichia chaffeensis* CARECE DE LPS Y PÉPTIDOGLICANOS

Los monocitos y macrófagos expresan receptores de superficie con patrones de reconocimiento, como los receptores tipo Toll (TLRs) y los dominios de oligomerización unidos a nucleótidos (NOD), los cuales contienen receptores intracelulares de proteínas que pueden reconocer y unirse a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) incluyendo a lipopolisacáridos (LPS) y péptidoglicanos. Estas uniones provocan respuestas inmunes innatas que generalmente eliminan a la mayoría de microorganismos del cuerpo humano (Rikihisa, 2009).

E. chaffeensis ha evolucionado, de manera que ha perdido todos los genes para la biosíntesis de LPS y casi todos los genes para la biosíntesis de péptidoglicanos, y por lo tanto este patógeno no desencadena una respuesta inmune innata efectiva (Rikihisa, 2003). Además, ésta sobrevive y se replica en las células del intestino medio y las glándulas salivares de la garrapata vector. Las células de los invertebrados también tienen fuertes mecanismos de defensa innata que responden a los PAMPs (Little *et al*, 2005). Por lo tanto, la pérdida de los genes para la biosíntesis de LPS y peptidoglicanos también facilita la adaptación de la bacteria a las células de la garrapata vector.

La pérdida de péptidoglicanos provee otros beneficios, le brinda a *E. chaffeensis* la flexibilidad para sobrevivir en el limitado espacio intravascular y la plasticidad requerida para que los leucocitos infectados puedan circular a nivel intravascular. Además la pérdida de estos genes explica la estructura inusual de esta bacteria, la cual es pleomórfica y está envuelta en una fina membrana externa ondeada que tiene un espacio periplásmico estrecho, y no hay evidencia de que tenga una capa capsular o pili (Rikihisa *et al*, 1997), por lo tanto, se cree que esta bacteria se une a las células hospederas a través de sus proteínas de membrana externa (OMP).

2.5.1.2 SECUESTRO DEL COLESTEROL DEL HOSPEDERO

E. chaffeensis es un agente muy sensible al estrés mecánico y es una bacteria pleomórfica gram-negativa. La incorporación de colesterol de la célula hospedera a la membrana del agente es esencial para bacterias frágiles y pleomórficas, y para micoplasmas, que carecen de pared celular (Dahl, 1993). Este agente carece de genes para la biosíntesis de Lípido A, por lo que ha evolucionado la habilidad para obtener colesterol de las células del hospedero (Lin y Rikihisa, 2003).

Se ha demostrado que esta bacteria contiene niveles significativos de colesterol en su membrana a través de técnicas como la microscopía fluorescente y análisis bioquímicos. El tratamiento de esta bacteria con un reactivo de extracción de colesterol causa cambios a nivel ultraestructural. Además el pre-tratamiento con un derivado fluorescente del colesterol resultó en la incapacidad de la bacteria para infectar las células hospederas, y por lo tanto en su muerte. La dependencia de este agente, al colesterol para la infección y supervivencia sugiere que los niveles de colesterol sanguíneos altos exacerban la severidad de la infección en mamíferos (Lin y Rikihisa, 2003; Rikihisa, 2009).

2.5.1.3 INTERNALIZACIÓN Y CREACIÓN DEL COMPARTIMENTO REPLICATIVO

La entrada de *E. chaffeensis* en las células hospederas es independiente de microfilamentos, es decir, no entra por fagocitosis, pero si es dependiente de actividad de transglutaminasas, las cuales son necesarias para que ocurra una endocitosis mediada por receptores (Lin *et al*, 2002). Un incremento del Calcio libre ($[Ca^{2+}]_i$) en el citoplasma del hospedero es esencial para que la bacteria pueda entrar en los monocitos y macrófagos. Esta bacteria induce el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ a través de los siguientes eventos de señalamiento: entrecruzamiento de proteínas por transglutaminasas, fosforilación de tirosinas, activación de la fosfolipasa C gamma 2 (PLC- γ 2) y la producción de IP₃ (Lin *et al*, 2002; Rikihisa, 2009).

La endocitosis mediada por caveolas o balsas lipídicas es un sistema de vesículas traficantes que sobrepasan las vías de los fagolisosomas, y por lo tanto es utilizada por una gran variedad de microorganismos patógenos que entran a las células del hospedero (Lafont y van der Goot, 2005). La entrada de *E. chaffeensis* involucra a este sistema (Lin y Rikihisa, 2003).

Las balsas lipídicas son microambientes lipídicos especializados en las superficies celulares. Éstos son ricos en colesterol, proteínas ancladas al glicosilfosfatidilinositol (GAPs),

gangliósidos de glicosfingolípidos G_{MI} , y diversos tipos de proteínas de membrana involucradas en transducción de señales como receptores, transductores de señales y transportadores de membrana (Simons y Toomre, 2000).

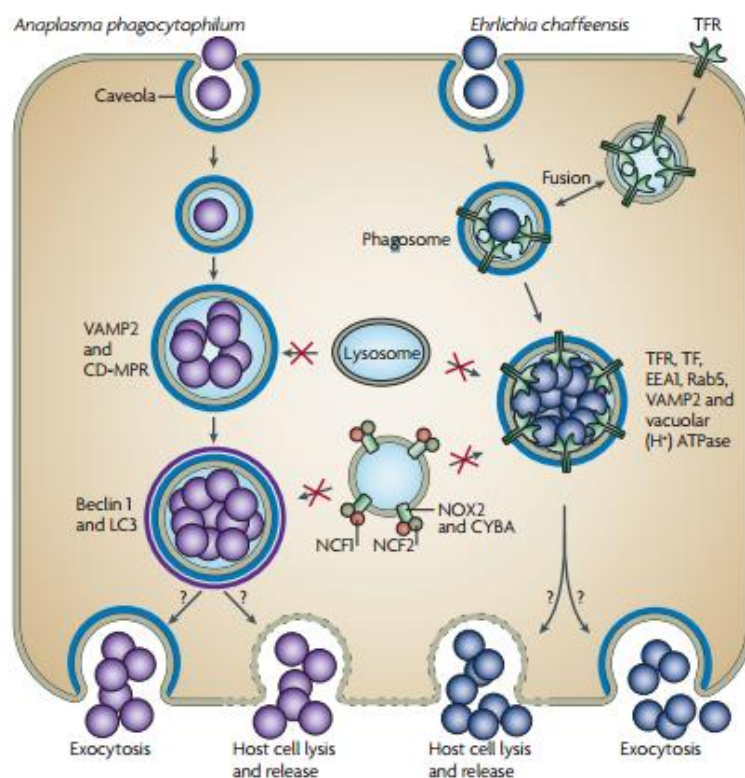


Figura 8.- Mecanismo de ingreso celular de *Ehrlichia chaffeensis* mediante caveolas.
(Tomado de: Rikihisa, 2010).

Las caveolas (Figura 8) se forman cuando las proteínas específicas de caveolas, las caveolinas, se acumulan (Anderson, 1998). Las caveolinas son proteínas integrales de la membrana plasmática que se unen fuertemente al colesterol. Las caveolas forman invaginaciones endocíticas y exocíticas únicas en las superficies de varios tipos de células y pueden importar moléculas a lugares específicos dentro de la célula o puede exportar moléculas a espacios extracelulares a través de un mecanismo dependiente de clatrina. Las caveolas también están implicadas en la compartimentalización de una gran variedad de actividades de señalamiento (Anderson, 1998; Simons y Toomre, 2000; Rikihisa, 2009).

Los GAPS se requieren para la internalización de *E. chaffeensis*. Mientras que la clatrina, una proteína involucrada en la endocitosis, nunca ha sido asociada a la internalización de esta bacteria (Barnewall *et al.*, 1997; Lin y Rikihisa, 1997; Rikihisa, 2009). La caveolina-1 y

las proteínas fosforiladoras de tirosina, incluyendo a la PLC- γ 2, están localizadas junto con las inclusiones replicadoras tempranas y tardías de *E. chaffeensis* (Lin y Rikihisa, 2003b).

Es muy probable, que la unión de *E. chaffeensis* a receptores no identificados activen algunos receptores de tirosina kinasas, éstas a su vez fosforilan proteínas en caveolas. PLC- γ 2 es una de las proteínas presentes en las células hospederas infectadas por *E. chaffeensis*, que son rápidamente fosforiladas por tirosinas (Lin *et al*, 2002). A su vez el sustrato de PLC- γ 2, el 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂), es también rico en caveolas (Galbiati *et al*, 2001). Las caveolas pueden facilitar la acción enzimática de PLC- γ 2, lo que conlleva a un incremento en los niveles intracelulares de Ca²⁺, el cual es esencial para la infección bacteriana (Lin *et al*, 2002).

Los monocitos eliminan microorganismos a través de mecanismos independientes de oxígeno, por ejemplo en la fusión de fagosomas que contienen bacterias y gránulos, que contienen péptidos antimicrobiales (como defensinas o lisosomas) y enzimas hidrolíticas de lisosomas, o a través del secuestro de nutrientes vitales (como el hierro) (Cohen, 1994). *E. chaffeensis* modula el tráfico de vesículas para evitar que lleguen a los lisosomas (Barnewall *et al*, 1997; Webster *et al*, 1998; Mott *et al*, 1999). Esta modulación es esencial, ya que estas bacterias residen exclusivamente en fagocitos con abundantes lisosomas (Rikihisa, 2009).

Las inclusiones de *E. chaffeensis* no se fusionan a los lisosomas, ya que sus compartimentos carecen de glicoproteínas de lisosomas y de actividad de fosfatasa ácida (Barnewall *et al*, 1997). La inhibición de la fusión a lisosomas es específica a vacuolas parasitóforas, pero ésta es reversible con el tratamiento con oxitetraciclinas (Wells *et al*, 1988).

E. chaffeensis usa diversas estrategias para evadir la fusión de lisosomas. Sus inclusiones replicativas son endosomas tempranos que no llegan a madurar a endosomas tardíos. Estos endosomas acumulan receptores de transferrina (TfRs) y tienen diversos marcadores de endosomas tempranos, como el Rab5 y el antígeno 1 de endosomas tempranos (EEA-1). Parece que esta bacteria usurpa de los lisosomas una vía fisiológica recicladora de TfRs, de esta manera evita la fusión de lisosomas (Rikihisa, 2003).

Una vez que la bacteria establece vacuolas para sobrevivir, necesita encontrar una forma de adquirir nutrientes, para luego poder proliferar en un compartimento. El hierro es un nutriente muy necesario para la supervivencia de esta bacteria. La adquisición de hierro es dependiente de un pool de hierro lábil presente en el citoplasma de las células hospederas. Rikihisa en el año 2002 encontró que este patógeno no puede establecer una infección cuando

los monocitos son tratados con un quelante de hierro llamado deferoxima. Una de las características de las inclusiones replicativas de *E. chaffeensis*, es su habilidad para acumular hierro unido a transferrina exógeno (Rikihisa, 2002), por lo tanto, la bacteria puede adquirir hierro directamente de la unión hierro-transferrina presente en las inclusiones.

2.5.1.4 SUBREGULACIÓN DE LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Los monocitos y macrófagos son mediadores primarios de un sistema de defensa dependiente de oxígeno que genera ROS (superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales de hidroxilo) en exposición a patógenos. Se ha encontrado que el genoma de *E. chaffeensis* no tiene genes codificadores de enzimas detoxificadoras (como SOD o catalasas) ni sistemas reguladores sensitivos de oxígeno de dos componentes (OxyR o SoxRS), lo que significa que esta bacteria ha evolucionado estrategias para prevenir la activación de NADPH oxidasa, la cual cataliza la reducción del oxígeno atmosférico a O_2^- utilizando el NADPH citoplásmico del hospedero, el ROS inicial que puede ser convertido en otros ROS (Rikihisa, 2009).

2.5.1.5 INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS EN LA CÉLULA HOSPEDERA

La apoptosis es un mecanismo muy importante para eliminar patógenos intracelulares. Una gran variedad de patógenos inducen la apoptosis de las células hospederas, pero se conoce otras, como *E. chaffeensis* que inhiben la apoptosis de células hospederas (DeLeo, 2004).

E. chaffeensis sobrerregula a NF- κ B y a inhibidores de apoptosis de la células hospederas y regula diferencialmente a las ciclinas celulares y la expresión de CDK (Zhang *et al*, 2004).

2.5.1.6 EL SISTEMA DE DOS COMPONENTES (TCS)

La transducción del TCS, una familia de sensores de señales, y sistemas de respuestas reguladoras evitan que las bacterias detecten una gran variedad de señales ambientales y hace que respondan rápidamente a los cambios en el ambiente a través de la activación o represión de un gen específico (Dorman *et al*, 2001). Los TCS son importantes en la habilidad de ciertas bacterias patógenas para que puedan montarse y establecer una infección exitosa en los hospederos. Esto se ha comprobado con los muchos ejemplos vistos en que se atenúa la virulencia de cepas patógenas al eliminar una o más TCS (Groisman, 2001).

2.5.1.7 ACTIVACIÓN DE CITOQUINAS

Debido a que no se ha encontrado actividades de endotoxinas o exotoxinas durante la infección de *E. chaffeensis*, las citoquinas pro-inflamatorias del hospedero son consideradas las responsables de los cambios patológicos y de los signos clínicos de la EMH (Rikihisa, 2003). Ya que el LPS no es detectable en esta bacteria, Lin y Rikihisa en 1996, hicieron experimentos para saber cómo y cuáles son los componentes de esta bacteria para inducir la expresión de citoquinas, y encontraron que parece ser que un residuo de carbohidrato del microorganismo es el responsable de la generación de IL-1 β , IL-8, e IL-10 por los monocitos humanos a las 24 horas de establecida la bacteria. Además ellos encontraron que la bacteria no inducía la producción de TNF- α , IL-6, y GM-CSF, lo que significaba que esto podría retardar el desarrollo del sistema inmune protector y por lo tanto ayudaba a que la bacteria se estableciera en macrófagos (Rikihisa *et al*, 2009).

Una vez establecida la bacteria, su plasticidad le ayuda a llegar a todo el cuerpo y causa diversos síntomas. Incluso, puede traspasar la barrera hematoencefálica causando trastornos como la meningoencefalitis. Las linfopenias asociadas a EMH son el resultado de eventos periféricos que pueden incluir un mayor secuestro, consumo o destrucción de células infectadas y no infectadas (Rikihisa *et al*, 2009).

2.5.2 INMUNOLOGÍA

Como con muchos aspectos de la patogénesis de la HME, sólo hay una comprensión naciente de los mecanismos inmunes que siguen a la infección con *E. chaffeensis* en un hospedero humano. Las contribuciones relativas de la inmunidad humoral y mediada por células no han sido definitivamente establecidas, aunque parecen desempeñar importantes papeles en las defensas hospederas contra este patógeno. Ya que las ehrlichias son patógenos intracelulares, es intuitivo que la inmunidad celular es un componente importante de la exitosa eliminación de *E. chaffeensis*. Este paradigma es sugerido directamente por las descripciones de enfermedad particularmente severa en los pacientes infectados con VIH e indirectamente por las observaciones de profundas respuestas linfoproliferativas descritas para los pacientes que se recuperan de la HME (Paddock y Childs, 2003).

En un estudio de 149 pacientes diagnosticados durante 1985 a 1990, fue utilizada la regresión logística para demostrar que la edad (≥ 60 años) operaba como un factor de riesgo independiente para la enfermedad severa o fatal. Sin embargo, muchos casos de enfermedad

severa o fatal han sido descritos en niños aparentemente saludables y en adultos jóvenes. En este contexto, la severidad de la enfermedad puede finalmente depender de una compleja interacción de varios componentes relacionados al hospedero, al patógeno y tal vez a las intervenciones terapéuticas.

La HME severa o fatal ha sido descrita en personas con inmunidad comprometida de variadas causas incluyendo la enfermedad del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las terapias inmunosupresoras, gammopatía monoclonal, asplenia, β -talasemia falciforme y el síndrome de Down (Paddock y Childs, 2003).

Variadas líneas consanguíneas de ratón han sido utilizadas para disecar el impacto de los procesos celulares y humorales después de la infección. Las líneas de ratón de campo infectadas con *E. chaffeensis* eliminan la bacteria dentro de los 16 días, mientras que los ratones con macrófagos y funciones de células T defectuosas mantienen las infecciones que pueden persistir por uno a varios meses. Los ratones que carecen de alelos funcionales del receptor 4 tipo toll (tlr4), cuyo producto génico es responsable de la estimulación de macrófagos después de la exposición al lipopolisacárido de bacterias gramnegativas, producen niveles significativamente disminuidos de óxido nítrico e interleucina 6 (IL-6) y desarrollan infecciones con *E. chaffeensis* que persisten por al menos 2 semanas más allá de la duración de la infección observada en ratones de campo. Sin embargo, la activación sola de macrófagos no parece ser suficiente para la exitosa eliminación de este patógeno (Paddock y Childs, 2003).

El papel de los genes del complejo de histocompatibilidad mayor clase II (MHC-II) parece ser aún más profundo y los ratones que carecen de genes MHC-II funcionales son incapaces de eliminar la *E. chaffeensis* después de la infección. Estos hallazgos sugieren que los linfocitos T CD4⁺ son esenciales para la completa eliminación de este patógeno intracelular. Estas observaciones son apoyadas por los resultados obtenidos con otros modelos murinos que utilizan animales inmunodeficientes. En contraste a los mutantes tlr4 y MHC-II que no llegan a enfermar o morir después de la infección con *E. chaffeensis*, los ratones SCID deficientes en linfocitos T y B desarrollan infecciones persistentes, contundentes y llegan a estar moribundos dentro de las 24 horas post-infección. Sin embargo, los animales con células B funcionales pero deficientes para células T α/β o células T α/β y γ/δ permanecen persistentemente infectados pero no llegan a enfermar. Similarmente, el suero inmune de los ratones inmunocompetentes o de MAbs que reconocen una proteína inmunodominante de membrana externa (p28) de *E. chaffeensis*, administrado pasivamente a ratones SCID antes o durante la infección activa, resulta en la protección de la enfermedad pero no tiene el efecto de eliminación bacteriana

completa. Colectivamente, estas observaciones en los sistemas murinos sugieren que los anticuerpos contribuyen a la eliminación de este patógeno durante la infección activa y pueden aliviar la enfermedad, y que la inmunidad celular intacta, que involucra particularmente los procesos coordinados por las células T CD4⁺, parecen ser determinantes cruciales de la recuperación completa después de la infección con este agente (Paddock y Childs, 2003).

Paradójicamente, la relativa escasez de bacterias detectada en la sangre y tejidos de la mayoría de pacientes infectados con *E. chaffeensis*, hasta aquellos con enfermedades severas, sugiere que las manifestaciones clínicas de la HME también pueden ser mediadas por las respuestas inmunes del hospedador y posiblemente amplificadas por la producción de citoquinas específicas. Los estudios in vitro han demostrado que los monocitos humanos infectados con *E. chaffeensis* sólo producen dos interleucinas pro-inflamatorias, IL-1 β e IL-8 y una citoquina inmunosupresora, IL-10 (Rikihisa, 1999). Sin embargo, cuando las células infectadas son expuestas a suero hiperinmune conteniendo anticuerpos IgG anti-*E. chaffeensis*, son generadas por las células citoquinas pro-inflamatorias adicionales, incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa y la IL-6. La unión del complejo *E. chaffeensis*-anticuerpo a los monocitos humanos vía el receptor Fc γ es requerida para la expresión de los ARNm de TNF- α e IL-6 y aumenta la expresión del ARNm de IL-1 β . La presencia de complejos inmunes también activa el factor nuclear kappa-B, estimulando adicionalmente la secreción de estas citoquinas. En concierto, estos procesos generan niveles de citoquinas pro-inflamatorias mayores tan altos como los niveles observados en las células estimuladas con el lipopolisacárido de *Escherichia coli*. Estos hallazgos sugieren que la generación de anticuerpos a *E. chaffeensis* puede desencadenar respuestas patofisiológicas perjudiciales para el hospedero a través de un mecanismo similar al choque endotóxico. En este contexto, la producción y modulación de citoquinas por los anticuerpos anti-*E. chaffeensis* pueden desempeñar papeles críticos en los procesos que involucran la eliminación del patógeno y la generación de la enfermedad sistémica (Paddock y Childs, 2003).

2.6 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico definitivo de HME se basa en la sintomatología clínica y se apoya en hallazgos de laboratorio para su confirmación. En orden de su aplicación rutinaria se encuentran las pruebas serológicas de medición de títulos de anticuerpos específicos, la detección de mórulas en sangre periférica o en leucocitos de líquido cefalorraquídeo, la detección de ADN de la bacteria vía PCR de sangre, o de líquido cefalorraquídeo y el aislamiento de la bacteria.

En cualquier proceso patológico para llegar al diagnóstico es necesario previamente presuponer la compatibilidad del proceso con el diagnóstico (Scott *et al*, 2001). Un mismo cuadro clínico puede ser compatible con varias enfermedades y una misma enfermedad puede tener presentaciones clínicas diversas; por ello, habitualmente se realiza una primera aproximación a los posibles diagnósticos diferenciales en base a las características clínicas del proceso y posteriormente se confirman o descartan estos diagnósticos con pruebas laboratoriales.

Hay que tener en cuenta, por un lado, las características clínicas y laboratoriales compatibles con ehrlichiosis y, por otro lado, aquellas pruebas que determinan directa o indirectamente la presencia del agente patógeno en el animal.

2.6.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Dentro de 1 a 2 semanas (promedio, 9 días) después de la exposición a una garrapata infectada, los pacientes experimentan signos clínicos caracterizados por malestar, dolor en la zona lumbar o síntomas gastrointestinales o pueden desarrollar una presentación repentina de fiebre (frecuentemente $> 39^{\circ}\text{C}$). Es más probable que los pacientes con HME busquen atención médica dentro de los 3 a 4 días después de la presentación de los síntomas y que los rasgos clínicos que presentan frecuentemente incluyan fiebre ($> 95\%$), dolor de cabeza (60 a 75%), mialgias (40 a 60%), náuseas (40 a 50%), artralgias (30 a 35%) y malestar (30 a 80%). Durante el curso de la enfermedad, otras manifestaciones de enfermedad multisistémica se desarrollan en aproximadamente 10 a 40% de los pacientes, incluyendo tos, faringitis, linfadenopatía, diarrea, vómitos, dolor abdominal y cambios en el estado mental. Las manifestaciones reportadas menos frecuentemente incluyen conjuntivitis (Simmons y Hughey, 1989; Berry *et al*, 1999), disuria y edema periférico (Paddock y Childs 2003).

El sarpullido (Figura 9) generalmente ocurre tarde en el curso de la enfermedad (promedio de 5 días después de la presentación), puede ser efímero o transitorio y puede implicar las extremidades, tronco, rostro o raramente, las palmas y plantas del pie. El sarpullido se da en un 30 a 40% de los pacientes, aunque es reportado más frecuentemente entre personas adultas infectadas con VIH y puede ocurrir en poco más de los dos tercios de los pacientes pediátricos (Edwards, 1994; Jacobs y Schutze, 1997).



Figura 9.- “Rash” observado en la infección por *Ehrlichia chaffeensis*.
(Tomado de: CDC, 2013).

Así pues, el cuadro clínico puede sugerir la presencia de ehrlichiosis, si bien no existen signos patognomónicos de la enfermedad. En cualquier caso, el análisis de la sintomatología clínica es fundamental para, en su caso, poner en marcha las pruebas encaminadas al diagnóstico de esta enfermedad.

2.6.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.6.2.1 EXAMEN HEMATOLÓGICO

Las citopenias de múltiples linajes son un rasgo de laboratorio distintivo de la HME temprana en el curso de la enfermedad y puede proporcionar indicios presuntivos para el diagnóstico. La mayoría de pacientes se presenta con un hematocrito normal; sin embargo, eventualmente se desarrolla la anemia en aproximadamente la mitad de los pacientes HME. La leucopenia leve a moderada es observada en aproximadamente 60 a 70% de los pacientes durante la primera semana de la enfermedad, con una disminución más larga ocurriendo en el conteo linfocítico total. Una linfocitosis relativa y absoluta (aproximadamente 45 a 85% del conteo de leucocitos totales) es vista en la mayoría de pacientes durante la recuperación y está caracterizada predominantemente por la expansión de células T activadas que expresan el receptor de células T

γ/δ . La trombocitopenia es la citopenia identificada más frecuentemente, siendo vista en 70 a 90% de los pacientes durante la enfermedad (Paddock y Childs, 2003).

Los resultados de pruebas como la hematología pueden ayudar al diagnóstico de ehrlichiosis canina. Entre los hallazgos que nos pueden hacer sospechar de la presencia de esta enfermedad se encuentra la trombocitopenia. Es éste el hallazgo más frecuente en perros con ehrlichiosis canina, apareciendo a los 15-20 días postinfección y pudiendo perdurar durante todas las fases de la enfermedad (Greene, 1997). El recuento plaquetario no siempre se correlaciona con la presencia y gravedad de cuadros hemorrágicos, pudiéndose encontrar trombocitopenia en ausencia de hemorragia y hemorragias en ausencia de trombocitopenia (Woody y Hoskins, 1991).

2.6.2.1.1 EXAMEN MICROSCÓPICO DEL AGENTE ETIOLÓGICO

Las mórulas han sido identificadas en los frotis de sangre periférica, preparaciones de capa leucocitaria y aspirados de médula ósea utilizando variadas tinciones tipo eosina-azul (Romanovsky), incluyendo la tinción de Wright, Diff-Quik, de Giemsa, de Leishman. Aunque esta técnica ofrece el método de diagnóstico más rápido, es considerado relativamente insensible y es raramente confirmatorio en la práctica clínica. En este contexto, los frotises positivos a mórulas son característicamente vistos en una minoría de pacientes, aún en pacientes de quienes el organismo ha sido aislado. Aún cuando son visualizadas, las mórulas son detectadas generalmente en poco menos del 5% de leucocitos circulantes (Paddock y Childs, 2003).

La observación de mórulas o inclusiones intracelulares compatibles con *E. canis* en el interior de monocitos y/o linfocitos de sangre circulante es diagnóstico de la infección (Elías, 1991). Sin embargo, es difícil la observación de estas formas debido a su pequeño tamaño y a que el total de células mononucleares infectadas suele ser inferior al 1%; este porcentaje se va reduciendo a medida que evoluciona la enfermedad (French y Harvey, 1983; Cowell *et al*, 1988).

La observación de las mórulas, si bien indica infección, no identifica el tipo de agente ehrlichial responsable de la misma. Las células hospederas de *E. canis* son solamente los leucocitos mononucleares. Se ha demostrado que los dos tipos de cuerpos de inclusión de *E. canis* descritos (inclusiones esféricas pequeñas y grandes) se presentan más frecuentemente que las mórulas en los perros febriles infectados. Este hallazgo facilita el diagnóstico de la ehrlichiosis en un área enzoótica, ya que el diagnóstico puede estar basado en la observación de estos cuerpos de inclusión.

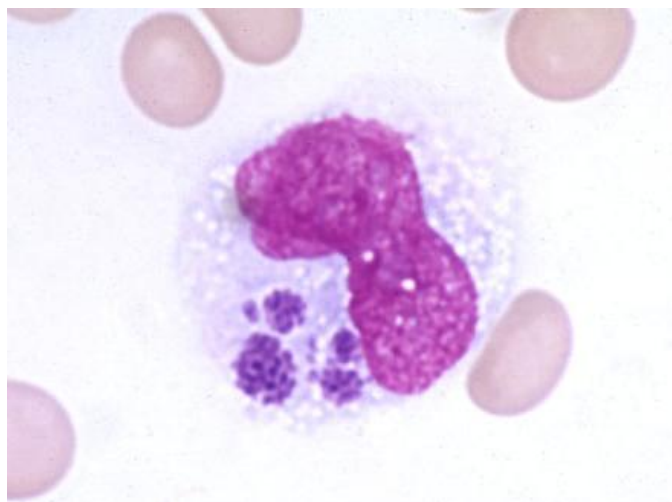


Figura 10.- Aspirado de Médula Ósea de un paciente con EMH. Mórula de *Ehrlichia chaffeensis* en monocito.

(Tomado de: Barenfanger, 1997).

Las mórulas (Figura 10) también pueden detectarse a partir de cultivos celulares a partir de sangre de perros infectados. Sin embargo, esta técnica no tiene utilidad clínica puesto que pueden pasar hasta 8 semanas en obtenerse cultivos positivos. Además, son costosos económicamente, sólo suelen estar disponibles en laboratorios especializados y no siempre se consigue el aislamiento; en todo caso, los cultivos son una importante herramienta de investigación (Neer *et al*, 2002).

2.6.2.2 BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

Niveles levemente o moderadamente elevados de transaminasa hepática son notados en aproximadamente 80 a 90% de los pacientes en algún punto durante su enfermedad. Es menos probable que los niveles de fosfatasa alcalina y bilirrubina estén elevados; sin embargo, estos marcadores pueden estar elevados en 25 a 60% de los pacientes. La hiponatremia leve a moderada ha sido reportada en poco más del 50% de pacientes adultos y 70% de pacientes pediátricos. Frecuentemente son observados niveles de sodio sérico de < 130 mEq/litro en personas con enfermedad severa (Paddock y Childs, 2003).

Pueden ocurrir otras variadas anormalidades bioquímicas, que reflejan el progreso de la enfermedad hasta la implicancia multisistémica. Éstas incluyen prolongados tiempos de tromboplastina parcial activada y protrombina, incrementados niveles de los productos de degradación de fibrina, elevaciones en los niveles de creatinina sérica, lactato deshidrogenasa, creatina fosfoquinasa y amilasa, y anormalidades electrolíticas que incluyen hipocalcemia,

hipomagnesemia e hipofosfatemia. Los procesos patofisiológicos responsables de las anormalidades electrolíticas no están bien comprendidos. En algunos pacientes también son notadas disminuidas concentraciones de albúmina y proteína en el suero, lo cual puede afectar la medición de algunos cationes divalentes.

La hiperglobulinemia suele corresponder a una gammapatía policlonal, como se puede apreciar por electroforesis. Ocasionalmente se puede detectar gammapatía monoclonal por aumento de inmunoglobulina G (Breitschwerdt *et al*, 1987 ; Hoskins, 1991). Acompañando a la hiperglobulinemia se suele encontrar una hipoalbuminemia, producida por diferentes causas como el agotamiento de la albúmina en el proceso inflamatorio y el catabolismo proteico asociado a la enfermedad (Hibler *et al*, 1986; Woody y Hoskins, 1991). Además, se ha observado una relación inversamente proporcional entre la cantidad de proteína perdida en orina y la concentración sérica de albúmina, por lo que la presencia de proteinuria es un indicador importante de la disminución de la albúmina (Greene, 1997).

2.6.2.3 UROANÁLISIS

En el uroanálisis las dos alteraciones más frecuentes son la proteinuria y la hematuria. La densidad específica de la orina se encuentra disminuida, así como los pacientes inmunosuprimidos es posible la aparición de infecciones secundarias con bacteriuria (Parnell, 2004). El análisis de orina demuestra proteinuria (1+ a 3+ de albúmina), hematuria microscópica (desde 4 a 30 células por campo de alta potencia), además 0 a 2 leucocitos por campo de alta potencia (valores normales: negativo) (Ripoll *et al.*, 1999).

2.6.2.4 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Las técnicas serológicas son las pruebas diagnósticas más utilizadas ante una infección ehrlichial (Figura 11). Estas técnicas no detectan el organismo causal, sino anticuerpos producidos frente a éste.

Los títulos elevados de anticuerpos se pueden observar tras la exposición al agente, durante la fase aguda, subclínica y crónica de la infección e incluso después de un tratamiento efectivo. Por ello es importante entender que un diagnóstico serológico positivo puede indicar infección activa, o simplemente exposición al agente, y que la interpretación de los resultados de estas pruebas siempre debe realizarse en el contexto del caso clínico y no de forma aislada (Cohn, 2003).

Como ocurre con otras enfermedades infecciosas, los altos títulos de anticuerpos no confieren inmunidad protectora por lo que una nueva exposición al agente causal podrá originar de nuevo el cuadro de ehrlichiosis, aunque suele cursar de un modo menos grave (Buhles *et al*, 1974).

2.6.2.4.1 PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La mayoría de pacientes con HME han sido diagnosticados por la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA). Actualmente, la IFA estándar para HME utiliza la cepa Arkansas de *E. chaffeensis* cultivada en células DH82 o células Vero como sustrato (Figura 11). Los sueros pareados colectados durante un intervalo de 3 a 6 semanas representan las muestras preferidas para la evaluación serológica de HME. Los anticuerpos inmunoglobulina M (IgM) e IgG pueden ser medidos utilizando la IFA; sin embargo, la prueba IFA para IgG es negativa en poco más del 80% de los pacientes durante la primera semana de la enfermedad y los títulos de IgM también pueden ser no informativos en este momento.

Es importante obtener una muestra sérica de fase convaleciente ya que la mayoría de pacientes (> 80%) han desarrollado títulos IFA diagnósticos a las 6 semanas post-infección. Desafortunadamente, para los propósitos de diagnóstico, los individuos con HME inicialmente se presentan para asistencia un promedio de 4 días después de la presentación de la enfermedad y frecuentemente esta visita inicial es el único momento en el cual una muestra sérica es obtenida.



Figura 11.- Kit comercial utilizado para inmunofluorescencia indirecta (IFI).

(Tomado de: Fuller Laboratories, 2014).

El impacto de estas observaciones sobre la vigilancia y sub-reporte de HME ha sido discutido. Hay disponibles pocos datos para describir la cinética del anticuerpo detectable por IFA para las infecciones por *E. chaffeensis* y ninguno ha sido publicado utilizando el antígeno de *E. chaffeensis* como un sustrato de análisis.

El diagnóstico de Ehrliquiosis en una persona con una enfermedad clínicamente compatible puede ser confirmado por seroconversión o un cambio cuatro veces o mayor en el título de anticuerpos (algunas veces limitado a un aumento en el título de anticuerpos) entre las muestras de fase aguda y de fase convaleciente (Figura 12). Las recomendaciones para diagnosticar HME en un paciente con enfermedad compatible, promulgadas por el Grupo de Trabajo en Enfoques de Consenso para ehrliquiosis incluye un solo título recíproco de ≥ 256 como suficiente para confirmar la enfermedad y un título de 64 indicando una HME probable; sin embargo, los esfuerzos de vigilancia nacional han considerado los casos con un solo título IFA de ≥ 64 sólo como probable HME, independientemente de la magnitud del título de corte.

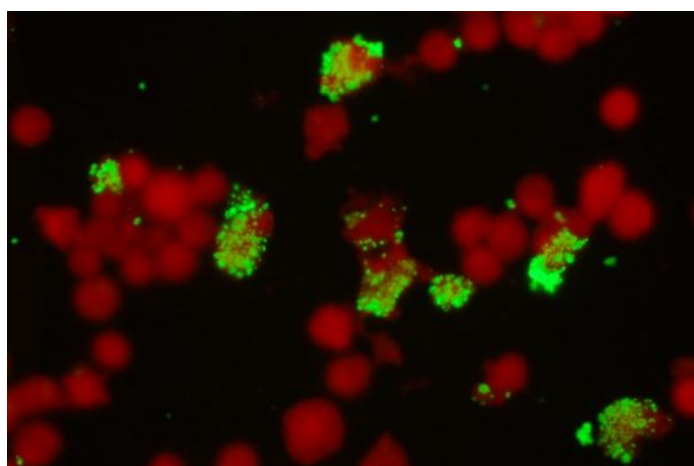


Figura 12.- Resultado positivo de IFI para *Ehrlichia chaffeensis*. Nótese la fluorescencia en monocitos DH82 (color rojo).
(Tomado de: Fuller Laboratories).

En relación con su especificidad, se ha comprobado la ausencia de reacciones cruzadas con un gran número de agentes: *Leptospira canicola*, *Brucella canis*, herpesvirus canino, virus de la parainfluenza, *Borrelia burgdorferi* y diversas *Rickettsias* como *R. tsutsugamushi*, *R. canada*, *R. burnetti*, *R. mooseri*, *R. akari* (Ristic *et al.*, 1981).

2.6.2.4.2 WESTERN BLOT

El uso de Western Blot ha permitido la identificación de una variabilidad antigénica en los aislamientos de *E. chaffeensis* y ha identificado una variabilidad en la reactividad del suero del paciente a diversos antígenos de *E. chaffeensis* (Brouqui *et al*, 1994; Chen *et al*, 1997).

2.6.2.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

La reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction o PCR) es una técnica molecular basada en las propiedades bioquímicas del ADN, asociadas a la composición y secuencia de nucleótidos. La PCR emplea segmentos cortos y simples de nucleótidos, llamados cebadores, cuyas secuencias son complementarias de las secuencias del ADN del organismo que se investiga. La amplificación de los cebadores permite la identificación del ADN bacteriano. Los cebadores y otros reactivos necesarios para que se produzca la reacción en cadena de la polimerasa se añaden a un volumen de solución que contiene ADN representativo de la muestra de estudio, incluido ADN del hospedador y del microorganismo que se busca. La muestra puede ser cualquier tejido del hospedador que pueda portar al agente investigado (Sellon, 2003).

Los cebadores empleados para la detección de agentes ehrlichiales pueden ser genéricos o especie-específicos. Los laboratorios de diagnóstico suelen emplear cebadores genéricos y, cuando el resultado es positivo, emplean cebadores especie-específicos (Cohn, 2003). Existen variaciones de la técnica según los cebadores empleados, la concentración de los reactivos, la temperatura y/o la duración de cada ciclo. El protocolo a utilizar no está consensuado a nivel general para todos los laboratorios, debiéndose en cualquier caso optimizar y homogenizar las condiciones de la técnica en cada laboratorio (Cohn, 2003).

Si bien en principio, el diagnóstico molecular parece el más específico y fiable en cuanto a la detección de organismos, tiene también sus limitaciones. Así la extremada sensibilidad de estas pruebas, puede conducir con facilidad a resultados falsos positivos por contaminación. Por otro lado, tras la muerte del microorganismo investigado, sus ácidos nucleicos pueden permanecer en el hospedador, sin que el periodo de permanencia de los mismos se conozca en la actualidad (Sellon, 2003).

Aunque es menos probable, se pueden observar falsos negativos debido a la presencia en la muestra de inhibidores de la PCR, como la heparina. También la elección de la muestra puede

condicionar los resultados. Las Ehrlichias y fundamentalmente *Ehrlichia canis* podrían permanecer secuestradas en células de tejidos del sistema mononuclear fagocitario (bazo, médula ósea); generalmente las muestras empleadas en el diagnóstico rutinario proceden de sangre del paciente, por lo que se podría obtener resultados negativos en sangre y existir *Ehrlichia canis* secuestrada en otros tejidos (Harrus *et al*, 1999).

Al comparar la PCR con otras técnicas diagnósticas, se observó que la sensibilidad para la detección de *E. canis* tanto en sangre como en otros tejidos, parece ser similar o ligeramente inferior a la de otras técnicas de uso habitual como la IFI o el ELISA (Rikihisa, 1996), por lo que las pruebas de diagnóstico molecular no deben suplir a las pruebas serológicas en el diagnóstico de la ehrlichiosis y deben considerarse pruebas complementarias a las tradicionalmente empleadas (Sellon, 2003).

El Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria recomienda que el empleo de técnicas de PCR para el diagnóstico de ehrlichiosis canina debe ir siempre acompañado de la realización de pruebas serológicas (Neer, 2000).

2.7 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD

El análisis de la susceptibilidad in Vitro ha demostrado que *E. chaffeensis* es resistente a los representantes de la mayoría de clases de antibióticos incluyendo los aminoglucósidos, fluoroquinolonas, penicilinas, macrólidos, cetólidos, clotrimazol y cefalosporinas. La rifampicina ejerce rápidamente efectos bactericidas in vitro; sin embargo, no hay datos clínicos que evalúen el uso de este antibiótico en pacientes con HME. (Paddock y Childs, 2003).

E. chaffeensis es susceptible a las tetraciclinas y sus derivados, estos fármacos, particularmente la doxiciclina, representan el tratamiento de elección para todas las personas con HME. La duración óptima de la terapia no ha sido establecida definitivamente; sin embargo, es aceptado un curso de tratamiento de 7 a 10 días, o al menos 3 días después de la disminución de la fiebre (Paddock y Childs, 2003). Sin embargo el tratamiento prolongado puede ser necesario para los casos graves o complicados con alguna otra enfermedad. (OIE, 2005).

La terapia con tetraciclina, iniciada en las etapas tempranas de la enfermedad, es efectiva disminuyendo la morbilidad y previniendo la mortalidad (Rikihisa, 1999). Seguido de

un tratamiento con otro antibiótico (ejemplo, amoxicilina) que es activo a *B. burgdorferi* para completar un ciclo completo de 14 días de tratamiento. Las personas sometidas a esta forma de tratamiento deben ser seguidas de cerca para asegurarse de que la enfermedad se ha resuelto por completo (Dumler *et al.*, 2005).

2.8 CONTROL Y PREVENCIÓN

Reducir el contacto con garrapatas infectadas disminuye el riesgo de adquirir HME. Ya que no es razonable asumir que una persona pueda eliminar todas las actividades que pueden resultar en estos contactos, las técnicas de prevención involucran principalmente la protección personal. (Paddock y Childs, 2003).

Para protegerse, mantener la ropa abrochada, con la camisa dentro de los pantalones y los pantalones dentro de las medias. Esta ropa debe ser clara así facilita la detección de garrapatas que se adhieren a las ropa o se arrastran. Ponga cinta adhesiva con el lado pegajoso hacia fuera alrededor de las botas para así atrapar las garrapatas (CDC, 2007). El uso de repelentes conteniendo DEET (n, n_dietil_m_toluamida) puede minimizar el riesgo de mordeduras por garrapatas. Sin embargo, la mejor medida de protección consiste de una completa examinación corporal para detectar garrapatas después de retornar de un área potencialmente infestada de garrapatas (Paddock y Childs, 2003).

No se sabe cuánto tiempo puede permanecer la garrapata adherida antes que pueda transmitir la *E. chaffeensis* a un hospedador; sin embargo generalmente requieren varias horas de adherencia antes que las bacterias sean transmitidas, las frecuentes inspecciones y una pronta remoción de las garrapatas adheridas utilizando tenazas o pinzas es un importante método para minimizar el riesgo de HME (Paddock y Childs, 2003).

2.8.1 CONTROL DE GARRAPATAS

Para controlar las infestaciones aplique los insecticidas ligeramente en lugares donde se han encontrado garrapatas o donde pueden estar escondidas. No aplique insecticida en los animales domésticos. Aplique alrededor de marcos de ventanas y puertas, grietas y donde duermen los animales domésticos (CDC, 2007).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 LUGAR Y ÉPOCA DE EJECUCIÓN DEL ESTUDIO.

El presente estudio se realizó en las siguientes dependencias de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM:

- *Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria:* Toma de muestras de sangre periférica / separación y conservación de sueros sanguíneos.
- *Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Animal:* Procesamiento de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

El estudio se realizó entre Enero del 2009 y Diciembre del 2010, abarcando las siguientes actividades generales:

- *Toma de muestras:* Enero – Diciembre del 2009.
- *Procesamiento de muestras:* Enero – Julio del 2010.
- *Análisis de resultados, elaboración de informes y redacción de tesis:* Agosto – Diciembre 2010.

3.2 MATERIALES.

Los materiales para la tomas de muestras de sangre periférica (realizadas en el Laboratorio de Patología Clínica) fueron los siguientes:

- Jeringas descartables de 5ml. (Nipro).
- Agujas hipodérmicas descartables de 21 x 1mm (Nipro).
- Algodón Hidrófilo (CKF).
- Alcohol de 96° (Alkofarma).
- Tubos comerciales con gel separador de suero (BD).
- Recipiente para residuos peligrosos (color rojo).

- Gradillas para tubos.
- Manguerillas de goma.
- Ficha de registro para cada participante del estudio.

Los materiales utilizados para la separación de los sueros sanguíneos y realización de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (realizadas en la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Animal) fueron clasificados de la siguiente manera:

a) Equipos:

- Microscopio de epifluorescencia (Leica).
- Incubadora (Gallenkamp Compenstat).
- Centrífuga convencional para tubos de prueba (Anke).
- Baño María AQUALine AL12 (Lauda).
- Agitador Vórtex Genie 2 (VWR Scientific).

b) Material de plástico/vidrio:

- Placas de 12 pocillos para IFI - *Ehrlichia chaffeensis* (Fuller Laboratories).
- Micropipeta calibrada de 10 ul. (Labystems/Pipetman).
- Micropipeta calibrada de 50 ul. (Labystems/Pipetman).
- Placas de microtitulación de 96 pocillos (Microtest™ 96).
- Viales autoclavables de 2 ml (Eppendorf).
- Soporte para viales de plástico.
- Tips (puntas) para micropipetas calibradas.
- Soporte metálico para micropipetas calibradas.
- Cámaras húmedas para placas de IFI.
- Vasos Coplin con tapa rosca (Wheaton C.O.).
- Pipetas de transferencia (chupones).
- Laminillas cubreobjetos de 22x60 (Coverglass).

c) Reactivos:

- Control positivo para *Ehrlichia chaffeensis* (Fuller Laboratories).
- Control negativo para *Ehrlichia chaffeensis* (Fuller Laboratories).
- Conjugado anti-IgG humano (Fuller Laboratories).
- Conjugado anti-IgG canino (Fuller Laboratories).
- PBS ph 9.0 (VMRD, Inc.).

- Aceite de inmersión para microscopía (Merck).
- Líquido de montaje (VMRD, Inc.).

d) Otros:

- Papel lente (VWR Scientific Products).
- Papel aluminio.
- Papel toalla.
- Plumón marcador.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 INDIVIDUOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO.

Se tomaron muestras de sangre periférica a propietarios de perros con antecedente de ehrlichiosis (máximo 1 año) en Lima Metropolitana. De cada persona muestreada se elaboró una ficha con información relevante, la cual incluyó los siguientes datos:

- Nombre del paciente.
- Edad.
- Sexo.
- Lugar de procedencia.
- Antecedentes de contacto con garrapatas (Se les pidió que respondieran un cuestionario sobre el posible contacto con animales o mordeduras de garrapatas).
- Sintomatología.
- Dirección.
- Teléfono.

Cada cuestionario fue llenado y firmado por las personas participantes del estudio, y en caso de los niños fue llenado por los padres de ellos, teniendo en claro los análisis que se les realizaron. Este documento fue utilizado en calidad de “*Consentimiento Informado*” para los registros del estudio.

Para el estudio se consideraron 95 personas sin distinción de edad, sexo, condición económica o alguna sintomatología, solo que cumplieran con los criterios de inclusión establecidos

en dicho estudio durante el periodo establecido para la obtención de muestras de sangre periférica (Enero – Diciembre 2009).

3.3.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

1. Propietarios de caninos domésticos (mínimo 1).
2. El canino debe tener o haber tenido ehrlichiosis en un periodo no mayor a 12 meses.

3.4 TOMA DE MUESTRAS.

A cada una de las personas participantes del estudio se les recolectó 5 ml. de sangre periférica en tubos comerciales con gel separador de suero (tapa amarilla) y la técnica de extracción de sangre periférica se basó estrictamente en las indicaciones recomendadas por el Instituto Nacional de Salud (INS):

1. Inicialmente, se verificó que los elementos utilizados se encuentren en condiciones adecuadas y que el individuo se sienta cómodo.
2. Se aplicó el torniquete aproximadamente cuatro dedos por encima de la flexión del codo o a 10 cm del codo, sujetando con un medio nudo.
3. Se limpió la zona con alcohol al 96% en un área de 2 pulgadas.
4. Se le indicó al individuo que abriera y cerrará la mano durante unos segundos y que después la mantuviera cerrada, esto ayudó a visualizar las venas superficiales de la fosa cubital.
5. Se retiró el estuche protector de la aguja y se cogió la jeringa de tal manera que el bisel se encuentre hacia arriba.
6. Se colocó la aguja en dirección paralela a la vena, perforando la piel y haciendo avanzar la misma 0,5 a 1cm. en el tejido subcutáneo, logrando la perforación de la vena.
7. Manteniendo la posición, se aspiró 5 ml. de sangre periférica con la jeringa estéril.
8. Se retiró el torniquete indicándole al individuo que abriera la mano, se colocó algodón seco encima de la punción y se retiró la aguja.
9. Se le indicó al individuo que flexionara la articulación del codo para facilitar el cierre de la zona de venipunción.
10. Inmediatamente, se retiró la aguja de la jeringa y se vertió el contenido en un tubo comercial con gel separador (tapa amarilla).
11. Finalmente, el tubo comercial con sangre entera fue rotulado y colocado en una gradilla de metal para que se forme adecuadamente el coágulo.

Los responsables de la evaluación clínica y toma de muestra de los individuos participantes en el estudio, fueron el Médico Cirujano Jorge Kohatzu Ishida (Colaborador de Estudios de Investigación CSI-UNMSM) y la QF. Msc. Olga Mirtha Li Elías (Jefa del Laboratorio de Patología Clínica FMV-UNMSM).

3.5 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de sangre fueron incubadas en baño maría a 37°C para favorecer la formación del coágulo sanguíneo. Luego de 20 minutos aproximadamente, se centrifugaron las muestras a 3,000 – 3,500 rpm por 10 min., para la separación de suero. Finalizada la centrifugación se colectó el suero en viales de 2ml. para almacenamiento en congelación (-20°C) hasta la realización de las pruebas serológicas.

3.5.1 PRUEBA SEROLÓGICA (INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA).

Las placas conteniendo células infectadas (DH82) con *Ehrlichia chaffeensis* (Fuller Laboratories) se descongelaron 30 minutos antes de realizar la prueba serológica. Mientras descongelaban las placas, se rotularon los viales donde se iban a hacer las diluciones respectivas, enumerándolos en orden correlativo.

El punto de corte para la prueba de IFI fue de 1:50 por lo que las diluciones se obtuvieron depositando inicialmente en cada vial 490 µl de PBS + leche descremada al 3% (Figura 13) e inmediatamente se agregó 10 µL de cada suero problema.

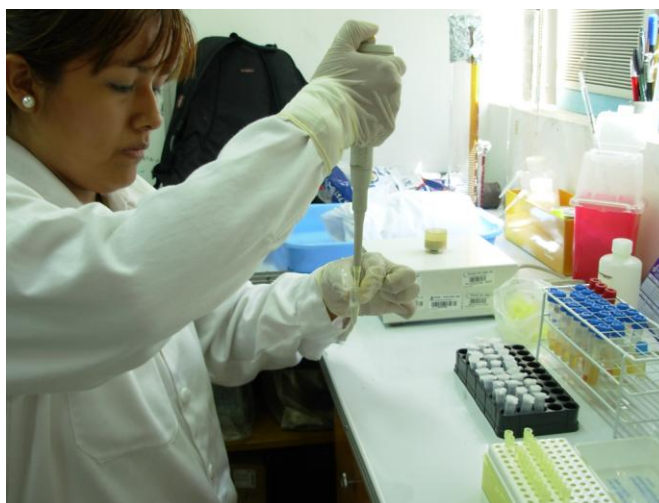


Figura 13.- Preparación de las diluciones de los sueros (1:50) con PBS + leche descremada al 3%.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta incluyó un primer período de incubación en el que se pusieron en contacto los antígenos (Ags) depositados en la placa comercial para IFI con los anticuerpos (Acs) del suero problema. Seguidamente, en un segundo período se añadió una anti-inmunoglobulina (Anti-Ig-FITC) conjugada con el marcador fluorescente para la lectura final.

3.5.1.1. PRIMERA REACCIÓN.

Las placas comerciales conteniendo células infectadas DH82 con *Ehrlichia chaffeensis* fueron marcadas en cada pocillo con el número del suero problema a evaluar y el símbolo positivo (+) y negativo (-) para los sueros control.

Se homogenizaron los viales preparados (dilución 1:50) previamente y se depositaron 10 µl de cada suero problema en cada uno de los pocillos marcados correlativamente (10 muestras problema), dejando dos pocillos libres para los controles (positivo y negativo), ya que cada placa comercial contenía 12 pocillos (Figura 14).



Figura 14.- Adición de 10ul. de suero sanguíneo por cada pocillo (10) de lectura.

Terminado este procedimiento, se incubaron las placas en cámara húmeda a 35°C por 40 minutos. Seguidamente, se retiraron las placas de la cámara húmeda, eliminando el excedente de suero y se realizaron lavados (tres veces) con PBS pH 9.0 de 2 minutos por lavado (cambiando la solución de PBS en cada lavado), para finalmente dejar las placas secando a temperatura ambiente.

3.5.1.2. SEGUNDA REACCIÓN.

Una vez secadas las placas (sin perder humedad en los pocillos), se agregaron 10 µl de conjugado a cada pocillo de las placas. Se depositaron 10 µl de conjugado Anti-IgG humano a cada uno de los pocillos (Figura 15) conteniendo los sueros problema y controles.



Figura 15.- Adición de 10ul. de conjugado Anti-IgG-FITC humano en las placas.

Seguidamente, se incubaron nuevamente las placas en cámara húmeda por 40 minutos y transcurrido este período de tiempo, se repitió el proceso de lavado con PBS (pH. 9.0) y secado anteriormente descrito en la primera reacción de la prueba serológica.

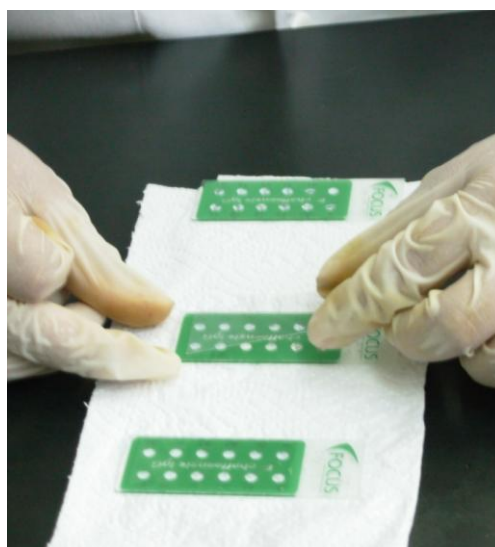


Figura 16.- Adición del medio de montaje (PBS pH. 9.0 + glicerol) y colocación de los cubreobjetos a las placas.

Se esperaron unos minutos (sin que los pocillos sequen completamente) y luego se colocó 10 µl de líquido de montaje (PBS pH 9.0 + glicerol) en cada uno de los pocillos, para luego colocar (con mucho cuidado) una laminilla cubreobjetos sobre la placa, retirando el excedente con papel toalla (Figura 16).

3.5.1.3. LECTURA DE PLACAS.

La lectura se realizó en un microscopio de epifluorescencia (Leica) con filtro azul, empleando el objetivo de 40X y 100X (para la toma de fotografías). Se inició la lectura identificando los pocillos control (positivo y negativo) para comprobar la reacción fluorescente positiva y la ausencia de la misma en el control negativo marcados anteriormente.



Figura 17.- Lectura de placas de *Ehrlichia cahffeensis* en microscopio de epifluorescencia.

A continuación, se leyeron los sueros problema identificando como positivos a todos aquellos que presentaron una reacción fluorescente similar y/o de mayor intensidad que la del control positivo, adjudicando un valor cualitativo por cruces a aquellos que presentaban una fluorescencia mayor que el control positivo (máximo 4 cruces).

Los sueros negativos no presentaron fluorescencia alguna y solo se observó con claridad el color rojizo ocre de las células (color de contraste) al igual que en la imagen del control negativo (Figura 17).

3.6 ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizaron cuadros de frecuencia (relativa y absoluta) para la presentación del porcentaje (%) de muestras seropositivas con *Ehrlichia chaffeensis*. Asimismo, mediante la prueba de Chi-cuadrado se analizó la *asociación estadística* entre las variables: sexo, edad y nivel de contacto con garrapatas frente a la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis*.

IV. RESULTADOS

Del total de personas evaluadas (95) mediante la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos (IgG) contra *Ehrlichia chaffeensis*, se obtuvo que el 31.6% (30/95) de propietarios de perros con antecedentes de ehrlichiosis presentaron seropositividad (Figura 18 y 19) contra el microorganismo (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Resultados de inmunofluorescencia indirecta (IFI) contra *E. chaffeensis*.

IFI contra <i>Ehrlichia chaffeensis</i>		
Resultados	N° de muestras	Porcentaje (%)
Positivos	30	31.6%
Negativos	65	68.4%
Total	95	100%

Las variables sexo (Cuadro 2) y nivel de contacto con perros con antecedentes de ehrlichiosis no presentaron asociación estadística a la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis*.

Cuadro 2.- Resultados de inmunofluorescencia indirecta (IFI) seropositiva contra *E. chaffeensis* clasificados según sexo.

IFI contra <i>Ehrlichia chaffeensis</i>		
Sexo	N° de muestras seropositivas	Porcentaje (%)
Masculino	10	33.3%
Femenino	20	66.7%
Total	30	100%

Las variables edad (Cuadro 3) y exposición a garrapatas (Cuadro 4) presentaron asociación estadística a la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* en propietarios de perros con antecedentes de ehrlichiosis.

Cuadro 3.- Resultados de inmunofluorescencia indirecta (IFI) seropositiva contra *E. chaffeensis* clasificados según edad.

IFI contra <i>Ehrlichia chaffeensis</i>		
Edad	N° de muestras seropositivas	Porcentaje (%)
Menores de 40 años	24	80%
Mayores de 40 años	6	20%
Total	30	100%

De los pacientes seropositivos, el 80% correspondieron a personas menores de 40 años (24/30), mientras que el 20% a personas de 40 años o más (6/30). Asimismo, de los pacientes seropositivos, el 93.3% estuvieron expuestos a garrapatas (28/30) mientras que el 6.7% no estuvieron expuestos (2/30).

Cuadro 4.- Resultados de inmunofluorescencia indirecta (IFI) seropositiva contra *E. chaffeensis* clasificados según exposición a garrapatas.

IFI contra <i>Ehrlichia chaffeensis</i>		
Exposición a garrapatas	N° de muestras seropositivas	Porcentaje (%)
Reporta exposición	28	93.3%
No reporta exposición	2	6.7%
Total	30	100%

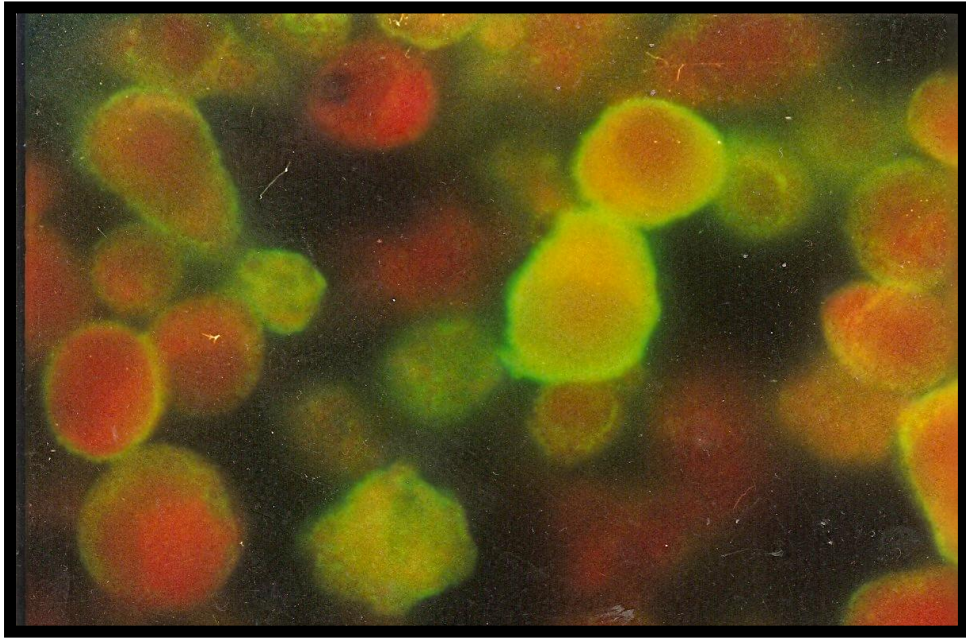


Figura 18.- Resultado positivo por inmunofluorescencia indirecta (IFI) contra *Ehrlichia chaffeensis*, dilución (1:50) – 400X.

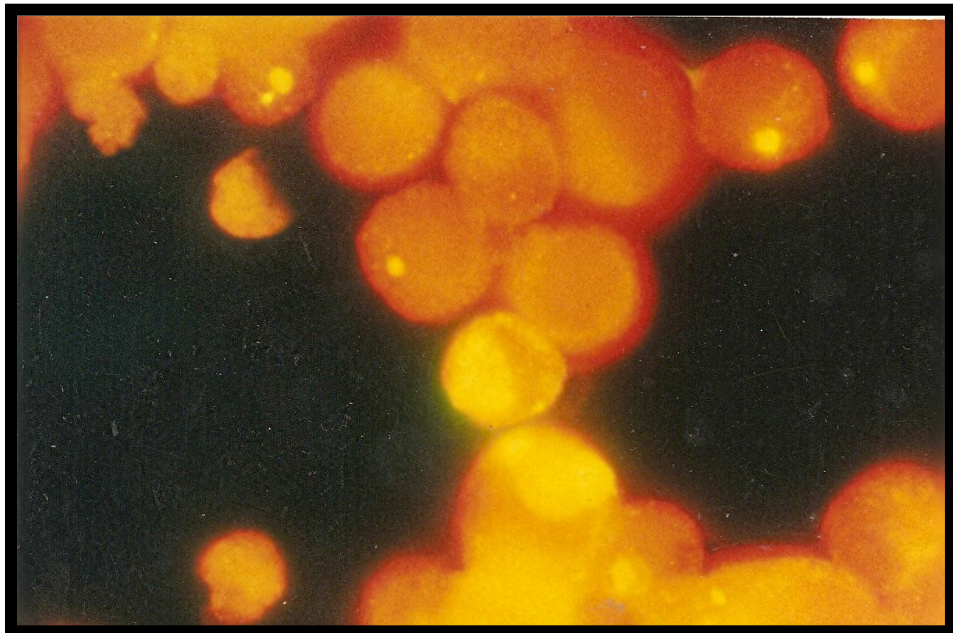


Figura 19.- Resultado negativo por inmunofluorescencia indirecta (IFI) contra *Ehrlichia chaffeensis*, dilución (1:50) – 400X.

V. DISCUSIÓN

Del total de personas evaluadas (95) mediante la técnica de IFI, se observó que el 31.6% (30/95) de propietarios de perros con antecedentes de ehrlichiosis presentaron anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* (Cuadro 1), los cuales son más altos que los reportados en Ancash por Anaya *et al.*, 2009, donde este grupo de investigación halló una seroprevalencia del 9.2%. De otro lado, nuestros resultados se relacionan con los publicados por Moro *et al.*, 2009, quienes reportaron seroprevalencias del agente causal de la EMH (*Ehrlichia chaffeensis*) similares a los porcentajes obtenidos en el presente estudio. Por ejemplo, se hallaron seroprevalencias del 25% en Piura, 23% en Cusco y 3% en Iquitos y Lima. Cabe resaltar que en Lima se halló un 3%, pero se colectaron las muestras de sangre periférica de personas provenientes de una comunidad rural de las afueras de la ciudad de Lima y además no se utilizaron criterios de inclusión que vincularan a estas personas con perros que padecían de ehrlichiosis. Recientemente, se ha publicado un estudio realizado en Lima Metropolitana (Paulino *et al.*, 2013), en el que se detectaron anticuerpos contra *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* en personas que realizaban actividades ligadas a la carrera de medicina veterinaria. Para ello se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), obteniéndose una frecuencia del 20 % de seropositividad en las muestras analizadas.

En Sudamérica, existen estudios realizados en diversos países que reportan seropositividad contra *Ehrlichia chaffeensis* en humanos, tal como los estudios de evidencia serológica de ehrlichiosis humana en Argentina (Ripoll *et al.*, 1999), Chile (López *et al.*, 2003), Venezuela (De Moraes *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2006) y Brasil (Da Costa, 2006). La mayor incidencia de estas infecciones se produce en los meses calurosos, debido al incremento de la actividad reproductiva

de las diferentes especies de garrapatas implicadas en la transmisión de estas bacterias (primavera-verano y principio de otoño) (Blanco *et al.*, 2002). En Chile y Argentina se identificaron anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* por primera vez en humanos en el año 1999 (López *et al.*, 1999; Ripoll *et al.*, 1999), encontrándose seroprevalencias del 11.8% y 14%, respectivamente. Mientras que en Brasil, se identificaron los primeros casos seropositivos en el estudio realizado por Costa, 2004. Además, en México las infecciones ehrlichiales humanas han sido reportadas en base a los datos serológicos utilizando *E. chaffeensis* como antígeno (Rikihisa, 1999).

Respecto a los resultados de la prueba de Chi cuadrado, se interpretaron de acuerdo a cada variable evaluada. En cuanto al sexo, en el presente estudio no se encontró asociación estadística frente a los resultados serológicos. Se halló un mayor porcentaje de seropositividad en mujeres del 66.7% respecto a los varones, que llegaron a un 33.3% del total de pacientes seropositivos. Al respecto, es importante indicar que cuando se realizaron las encuestas previas a la toma de muestra, la mayoría de mujeres manifestaban que ellas cuidaban principalmente a las mascotas y que permanecían un mayor período de tiempo en el hogar junto a ellas, aumentando así el riesgo de exposición a garrapatas infectadas. Según los reportes en EE.UU., existe una mayor incidencia en pacientes del sexo masculino, esto, debido a la actividad ocupacional de los hombres en zonas rurales, donde se han reportado la mayor cantidad de casos de EMH y en parte a la actividad recreacional de los mismos (Stone *et al.*, 2005).

Referente al nivel de contacto con perros, no se encontró asociación estadística a la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* en propietarios de perros con antecedentes de ehrlichiosis. Existen estudios que establecen que el contacto con perros no parece ser un factor de riesgo para la infección en el hombre (Harkess *et al.*, 1989), existiendo inclusive reportes en los que los perros pertenecientes a pacientes con ehrlichiosis humana no presentan evidencia serológica reciente (Rohrbach *et al.*, 1990); pero en contraste existen otros estudios que le dan crédito a la

participación del perro como factor de riesgo en la transmisión de ehrlichiosis en humanos (Paddock y Childs, 2003).

En cuanto a la edad, se encontró que el 80% de las personas seropositivas eran menores de 40 años (24/30), mientras que el 20% resultaron ser personas de 40 años o más (6/30), encontrándose significancia estadística con el grupo de pacientes menores de 40 años. Referente a estos resultados, esta reportado que la casuística de EMH es mayor en pacientes que superan los 40 años de edad (Paddock y Childs, 2003), pero cabe recalcar que en el presente estudio hubo una mayor disponibilidad de muestras provenientes de individuos jóvenes (menores de cuarenta años), aumentando así el porcentaje en este grupo etario.

Asimismo, el 93.3% de los individuos seropositivos reportó haber estado expuesto a garrapatas (28/30), mientras que el 6.7% no reportó exposición a estos artrópodos (2/30). Esta variable presentó asociación estadística para el grupo de personas que estuvieron expuestos a garrapatas. No se conocen los reservorios ni vectores que están involucrados en el ciclo de la infección de *Ehrlichia chaffeensis* en el Perú, pero se cree que los perros pueden servir como reservorio en el Perú, debido a que Paddock y Childs en el 2003, describen a los perros como los reservorios más importantes para todos los patógenos zoonóticos debido a su gran número, a su estilo de vida libre (callejeros) que les da acceso a lugares infestados con garrapatas y a su proximidad con los humanos. Adicionalmente, diversos autores (Breitschwerdt, 1998; Frank y Breitschwerdt, 1999; Zhang *et al*, 2003) han aislado a *Ehrlichia chaffeensis* a partir de muestras de sangre periférica de perros. Finalmente, se sospecha que el *Rhipicephalus sanguineus* (garrapata parda del perro) podría ser el vector en nuestro medio, debido a su amplia distribución en Lima (Bustamante, 1998; Liberato, 1998) y al reporte realizado por NDip *et al.*, 2009, en el que se aisló ADN de *Ehrlichia chaffeensis* en *Rhipicephalus sanguineus* de Camerún. Es importante indicar que esta garrapata es la única reportada ligada a los perros en Lima Metropolitana (Estares, 1999).

VI. CONCLUSIONES

- El presente estudio reportó una seropositividad contra *Ehrlichia chaffeensis* del 31.6% en propietarios de perros con antecedentes de ehrlichiosis en Lima Metropolitana.
- Se determinó que existe asociación estadística significativa entre la edad y exposición a garrapatas con respecto a la seropositividad contra *Ehrlichia chaffeensis*.

VII. RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar más estudios de investigación en ehrlichiosis humana para hallar el vector responsable de la transmisión en nuestro medio, así como el reservorio local de la EMH, para iniciar un programa de vigilancia epidemiológica en coordinación con DIGESA.
- Se recomienda que se informe sobre la presencia de *Ehrlichia chaffeensis* en nuestro país para que la EMH sea considerada dentro del diagnóstico diferencial para enfermedades febriles e inespecíficas en humanos.
- Controlar los casos de ehrlichiosis en animales (control de garrapatas), ya que podrían actuar como reservorios para infecciones en humanos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- **Abarca K, López J, Perret C, Guerrero J, Godoy P, Veloz A, Valiente-Cheverría F, León U, Gutjahr C, Azócar T. 2007.** *Anaplasma platys* in Dogs, Chile. *Emerging Infectious Disease* 13:1392-1395.
- **Adrianzén G, Chávez A, Casas E, Li O. 2003.** Seroprevalencia de la *Dirofilariosis* y *ehrlichiosis* canina en tres distritos de Lima *RIVET* 14:43-48.
- **Anaya E, Morón C, Jaramillo K, Mendoza L, Román R. 2009.** Evidencia serológica de *ehrlichiosis* humana en Ancash, Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 26: 54-57.
- **Anderson BE. 1991.** *Ehrlichia Chaffensis*, a new Species Associated with Human Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 2838-2842.
- **Anderson RG. 1998.** The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem* 67:199-225.
- **Alekseev AN, Dubinina HV, Semenov AV, Bolshakov CV. 2001.** Evidence of *ehrlichiosis* agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. *J. Med. Entomol* 38:471-474
- **Barros MD, Messick JB, Mello Figueiredo Cerqueira A, Alexandre Freire IM, Coelho Linhares GF, Oliveira Almeida NK, Pereira Almonsy NR. 2005.** Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Clinical Pathology* 34:44-48.

- **Bakken JS, Krueth J, Wilson-Nordskog C, Tildes RL, Asanovich K, Dumler JS. 1996.** Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *J Am Med Assoc* 275:199-205.
- **Bakken JS, Dumler JS. 2000.** Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 31:554-560.
- **Barnewall RE, Rikihisa Y, Lee EH. 1997.** *Ehrlichia chaffeensis* inclusions and early endosomes which selectively accumulate transferrin receptor. *Infect Immun* 65:1455-1461.
- **Barenfanger, J. 1997.** Memorial Medical Center - American Society for Microbiology. Disponible en : <http://www.asm.org/division/c/rickett.htm>
- **Berry DS, Miller RS, Hooke JA, Massung RF, Bennett J, Ottolini MG. 1999.** Ehrlichial meningitis with cerebrospinal fluid morulae. *Pediatric Infect Dis J* 18:552-555.
- **Blanco JR, Oteo JA. 2002.** Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect* 8: 763-72.
- **Bojersson, D. 2000.** Ehrlichiosis: new perspectives on pathogenesis and diagnosis. Proceedings 18th ACVIM, Seattle.
- **Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. 1998.** Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella visonii*. *J Clin Microbiol* 36:2645-51.
- **Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 1999.** Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. México: El Manual Moderno. 677 p.
- **Brouqui P, Lecam C, Olson J, Raoult D. 1994.** Serologic diagnosis of human monocytic ehrlichiosis by immunoblot analysis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 1:645-649.

- **Brouqui P, Dumler JS. 2000.** Serologic evidence of human monocytic and granulocytic ehrlichiosis in Israel. *Emerg Infect Dis* 6:314–315.
- **Buhles WC, Huxsoll DL, Ristic M. 1974.** Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic responses of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. *J Infect Dis* 130:357-367.
- **Buller RS, Arens M, Hmiel SP. 1999.** *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N Engl J Med* 341:148-155.
- **Bustamante, A. 1998.** Prevalencia de ectoparásitos en *Canis familiaris* en la zona climática litoral de Lima Metropolitana en la estación de invierno. Tesis de Bachillerato. Fac. Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 43 p.
- **Cao WC, Gao YM, Zhang PH, Zhang XT, Dai QH, Dumler JS, Fang LQ, Yang H. 2000.** Identification of *Ehrlichia chaffeensis* by nested PCR in ticks from southern China. *J Clin Microbiol* 38:2778–2780.
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013.** Ehrlichiosis. Disponible en : <http://www.cdc.gov/ehrlichiosis/>
- **Comer JA, Nicholson WL, Paddock CD, Sumner JW, Childs JE. 2000.** Detection of antibodies reactive with *Ehrlichia chaffeensis* in the raccoon. *J Wildl Dis* 36:705–712.
- **Cohn LA. 2003.** Ehrlichiosis and related infections. *Vet Clin North Am. Small Anim Pract* 33:863-884.
- **Cowell RL, Tyler RD, Clinkenberad KD. 1988.** Ehrlichiosis and poliartthritis in three dogs. *J Am Vet Med Assoc* 192:1093-1095.
- **Cupp EW. 1991.** Biology of ticks: Tick-transmitted diseases. *Vet Clin North Am. Small Anim Pract* 21:1-26.
- **Chavera A, Viera F, Samamé H. 1982.** Ehrlichiosis Canina en el Perú. Anales del VII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias, Ica – Perú.

- **Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. 1994.** Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 32: 589-95.
- **Chen SM, Yu XJ, Popov VL, Westerman EL, Hamilton FG, Walker DH. 1997a.** Genetic and antigenic diversity of *Ehrlichia chaffeensis*: comparative analysis of a novel human strain from Oklahoma and previously isolated strains. *J Infect Dis* 175:856–863.
- **Chen SM, Cullman LC, Walker DH. 1997b.** Western immunoblotting analysis of the antibody responses of patients with human monocytotropic ehrlichiosis to different strains of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 4:731–735.
- **Da Costa PSG.2004.** Evidencias serológicas de infeccoes por R
- **Da Costa PS, Valle LM, Brigatte ME, Greco DB. 2006.** More about human monocytotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases. *Braz J Infect Dis* 10: 7-10.
- **Davidson WR, Lockhart JM, Stallknecht DE, Howerth EW. 1999.** Susceptibility of red and gray foxes to infection by *Ehrlichia chaffeensis*. *J Wildl Dis* 35:696–702.
- **Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, Sánchez J, Goldsmith C. 1991.** Isolation and characterization of an *Ehrlichia* from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 29 : 2741 - 2745.
- **De Morais H, Hoskin J, Pereira N, Labarthe N.2004.** Guidelines for diagnosis and management of dog infected with *Ehrlichia* spp. *Clínica Veterinaria* 48: 28-30.
- **De Leo FR. 2004.** Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis* 9: 399-413.
- **Dorman CJ, McKenna S, Beloin C. 2001.** Regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*, a facultative intracellular pathogen. *Int J Med Microbiol* 291:89-96.

- **Dugan VG, Little SE, Stallknecht DE, Beall AD. 2000.** Natural infection of domestic goats with *Ehrlichia chaffeensis*. J Clin Microbiol 38:448–449.
- **Dumler, J. S., Dawson, J. E. and Walker D. H. 1993.** Human Ehrlichiosis: Hematopathology and Immunohistologic Detection of *Ehrlichia chaffeensis* 24: 391-396.
- **Dumler JS, Bakken JS. 1995.** Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections. Clin Infect Dis 20:1102-10.
- **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa. 2001.** Reorganization of genera in the family's *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol 51, 2145-2165.
- **Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. 2007.** Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. Clin Infect Dis 45: 45-51.
- **Edwards M S. 1994.** Ehrlichiosis in children. Semin. Pediatr Infect Dis 5:143–147.
- **Elias E. 1991.** Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E.canis*. Journal of Small Animal practice33: 540-543.
- **Estares, L. 1999.** Prevalencia de ectoparásitos de *Canis familiaris* en los distritos de San Juan de Lurigancho, San Martín de Porres, Comas e Independencia de Lima Metropolitana. Tesis de Médico Veterinario. Fac. Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 61 p.
- **Ettinger SJ. 1992.** Tratado de medicina interna. Enfermedades del perro y del Gato. México: Inter-Médica. 297-299p.
- **Frank JR, Breitschwerdt EB. 1999.** A retrospective study of Ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. J Vet Intern Med 13:194–201.

- **French TW, Harvey JW. 1983.** Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *Am J Vet Res* 44:2407-2411.
- **Fuller Laboratories. 2014.** *Ehrlichia* products. Disponible en : http://www.fullerlabs.com/products/veterinary/international/iv-ehrlichia/iv-ehrlichia_products/
- **Greene RT. 1997.** Ehrlichiosis canina: Implicaciones clínicas de factores humorales. En Kirk (ed), *Terapéutica Veterinaria de Pequeños animales*. 12ava ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México. 317-320.
- **Goddard J, Varela-Stokes AS. 2008.** Role of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), in human and animal diseases. *Veterinary Parasitology* 160:1-12.
- **Groisman EA. 2001.** The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol* 183:1835-1842.
- **Groves MG, Dennis GL, Amyx HL, Huxsoll DL. 1975.** Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res* 36: 937-940.
- **Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen WCA. 1999.** Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 71:2516-252.
- **Hibler SC, Hoskins JD, Greene CE. 1986.** Rickettsial infections in dogs: part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 106-114.
- **Holderman CJ y Kaufman PE. 2013.** *Amblyomma americanum* (Linnaeus) (Acari : Ixodidae). Entomology and Nematology Department – University of Florida. Disponible en : http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/medical/lone_star_tick.htm
- **Hoskins JD. 1991.** The brown dog tick. *Vet Clin North Am. Small Anim Pract* 21:99-101.
- **Jacobs RF, Schutze GE. 1997.** Ehrlichiosis in children. *J. Pediatr* 131:184–192.

- **Kidd L, Breitschwerdt EB. 2003.** Transmission times and prevention of tick-borne diseases in dogs. *Compendium* 25:742-751.
- **Kocan AA, Levesque GC, Whitworth LC, Murphy GL, Ewing SA, Barker RW. 2000.** Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. *Emerg Infect Dis* 6:477-480.
- **Kopecky J, Kuthejlova M, Pechova J. 1999.** Salivary glands extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunol* 21:351-6.
- **Kramer VL, Randolph MP, Hui LT, Irwin WE, Gutierrez AG, Vugia D. J. 1999.** Detection of the agents of human ehrlichioses in ixodid ticks from California. *Am J Trop Med Hyg* 60:62-65.
- **LaFont F, van der Goot FG. 2005.** Bacterial infection via lipid rafts. *Cell Microbiol* 7:613-620.
- **Liberato, W. 1998.** Prevalencia de ectoparásitos en *Canis familiaris* en los distritos de San Juan de Miraflores, Villa María del Triunfo y Villa el Salvador. Tesis de Bachillerato. Fac. Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 31 p.
- **Lin M, Zhu MX, Rikihisa Y. 2002.** Rapid activation of proteine tyrosine kinase and phospholipase C-gamma 2 and increase in cytosolic free calcium are required by *Ehrlichia chaffeensis* for internalization and growth in THP-1 cells. *Infect Immun* 70:889-898.
- **Little T, Hultmark D, Read AF. 2005.** Invertebrate Immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nat Immunol* 6:651-654.
- **Lockhart, JM, Davidson WR, Stallknecht DE, Dawson JE. 1998.** Lack of seroreactivity to *Ehrlichia chaffeensis* among rodent populations. *J Wildl Dis* 34:392-396.

- **López J, Rivera M, Concha JC, Gatica S, Loeffholz M, Barriga O. 2003.** Ehrlichiosis humana en Chile, evidencia serológica. Rev méd Chile 131:67-70.
- **Lovera E, Li O, Perales R, Falcón N, Ríos P. 2011.** Valores hematológicos y bioquímica renal referenciales de Venados Cola Blanca (*Odocoileus virginianus peruvianus*) en cautiverio. RIVET 22: 28-34.
- **Machado RZ, Duarte JM, Dagnone AS, Szabó MPJ. 2006.** Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). Veterinary Parasitology 139:262-266.
- **Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, Ristic M, Cox D, McDade JE. 1987.** Human infection with *Ehrlichia canis* a leukocytic rickettsia. N Engl J Med. 853-856.
- **Misao T, Kobayashi Y. 1955.** Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow and lymph node of patients with infectious mononucleosis using mice. Kiushu J Med Sci 6:145-152.
- **Morais JD, Dawson JE, Greene C, Filipe AR, Galhardas LC, Bacellar F. 1991.** First European case of Ehrlichiosis. Lancet 338:633-634.
- **Moro P, Shah Y, Li O, Gilman R, Nick Harris, Moro MH. 2009.** Short Report: Serologic Evidence of Human Ehrlichiosis in Peru. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 242-244
- **Mott J, Barnewall RE, Rikihisa Y. 1999.** Human granulocytic Ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells. Infect. Immun 67:1368-1378.
- **Ndip LM, Ndip RN, Esemu SN, Walker DH, McBride JW. 2009.** Predominance of *Ehrlichia chaffeensis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from kennel-confined dogs in Limbe, Cameroon. Exp Appl Acarol 50:163-16.

- **Neer TM. 2000.** Ehrlichiosis monocítica y granulocítica canina. En C. E. Greene (ed.), Enfermedades infecciosas en perros y gatos. McGraw-Hill. Interamericana. México. 153-163
- **OIE. 2005.** Ehrlichiosis. Center for Food Security and Public Health.
- **Olano JP, Masters E, Hogrefe W, Walker DH. 2003.** Human monocytotropic ehrlichiosis, Missouri. Emerg Infect Dis 9:1579-1586.
- **Paddock CD, Childs JE. 2003a.** *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. Clin Microbiol Rev 16:37-64.
- **Paddock CD, Childs JE. 2003b.** “The ascendancy of *Amblyomma americanum* as a vector of pathogens affecting humans in the United States “. Annu Rev Entomol 48:307-37.
- **Parnell, N. 2004.** Ehrlichiosis canina. En R. V. Morgan (ed.), Clínica de pequeños animales. El Sevier. España. 1122-1124
- **Paulino A, Li O, Hoyos L, Suárez F, Díaz D. 2013.** Detección serológica de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* en personal de clínicas veterinarias en Lima Metropolitana. RIVET 24: 217-221.
- **Pérez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rihisa Y. 2006.** Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. Annals of the New York Academy of Sciences 1078: 110-117.
- **Prescott L, Harley J, Klein D. 1999.** Microbiología. España. 4a Ed. McGraw-Hill Interamericana. 475-6p.
- **Popov VL, Han VC, Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH. 1998.** Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. J Med Microbiol 47:235-251.
- **Ripoll CM, Remondegui CE, Ordonez G, Arazamendi R, Fusaro H, Hyman MJ, et al. 1999.** Evidence for rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in subtropical territory of Jujuy, Argentina. Am J Trop Med Hyg 61: 350-54.

- **Rikihisa Y, Zhi N, Wormser GP, Wen B, Horowitz HW, Hechemy KE. 1997.** Ultrastructural and antigenic characterization of a granulocytic ehrlichiosis agent directly isolated and stably cultivated from a patient in New York State. *J Infect Dis* 175:210-213.
- **Rikihisa Y. 1999.** Clinical and biological aspects of infection caused by *Ehrlichia chaffeensis*. *Microbes Infect* 1:367-376.
- **Rikihisa Y. 2003.** Mechanism to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. *Ann NY AcadSci* 990:548-555.
- **Rikihisa Y. 2009.** Molecular events involved in cellular invasion by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology* 167:155-166.
- **Rikihisa Y. 2010.** *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nature Reviews – Microbiology* 8: 328-339.
- **Ristic M, Huxsoll DL, Tachibana N, Rapmund G. 1981.** Evidence of a serologic relationship between *Ehrlichia canis* and *Rickettsia sennetsu*. *Am J Trop Med Hyg* 30(6):1324-1328.
- **Roland WE, Everett ED, Cyr TL, Hasan SZ, Dommaraju CB, McDonald GA. 1998.** *Ehrlichia chaffeensis* in Missouri ticks. *Am J Trop Med Hyg* 59:641–643.
- **Sainz A, Amusatogui I, Rodríguez F, Tesouro MA. 2000.** La ehrlichiosis en el perro: presente y futuro http://www.colvet.es/madrid/revista/may_jun_00/peq_animales.htm.
- **San Miguel CS. 2006.** Prevalencia de *Ehrlichia canis* en Caninos de la provincia de Sullana: Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Alas Peruanas.
- **Scott DW, Miller WH, Griffin GE. 2001.** *Small Animal Dermatology. Diagnostic Methods.* 6th ed. W.B. Saunders Company. 93-94.
- **Sellon RK. 2003.** Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33:677-693.

- **Shibata S, Kawahara M, Rikihisa Y, Fujita H, Watanabe Y, Suto S, Ito T. 2000.** New *Ehrlichia* Species Closely Related to *Ehrlichia chaffeensis* Isolated from *Ixodes ovatus* Ticks in Japan 38: 1331-1338.
- **Simons K, Toomre D. 2000.** Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 1:31-39.
- **Tamí I, Jordán L. 2002.** Identificación de mórulas de *Ehrlichia* en plaquetas de sangre humana en Venezuela. Antib e Inf 10: 123-128.
- **Tamí I. 2003.** Ehrlichiosis humana: *Ehrlichia* trombocítica en sangre periférica. Rev Soc Ven Microbiol. 23. n. 2.
- **Tomassone L, Nuñez P, Gürtler RE, Ceballos LA, Orozco MM, Kitron UD, Farber M. 2008.** *Ehrlichia chaffeensis* in *Amblyomma parvum* Ticks, Argentina. EID Journal 14: 1080-6059
- **Troyes L, Fuentes L, Troyes M, Canelo L, García M, Anaya E, et al. 2006.** Etiología del síndrome febril agudo en la provincia de Jaén, Perú 2004-2005. Rev Peru Med Exp Salud Publica 23: 5-11.
- **Uhaa IJ, McLean JD, Greene CR, Fishbein DB. 1992.** A case of human ehrlichiosis acquired in Mali: clinical and laboratoey findings. Am J Trop Med Hyg 46:161-164.
- **Vinasco J, Li O, Alvarado A, Díaz D, Hoyos L, Tabachi L, Sirigireddy K, Ferguson C, Moro MH. 2007.** Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. Journal of Clinical Microbiology 2716-2719.
- **Webster P IJdo JW, Chicoine LM, Fikrig E. 1998.** The agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis resides in an endosoma compartment. J Clin Invest 101: 1932-1941.
- **Wells CL, Jechorek RP, Maddaus MA, Simmons RL. 1988.** Effects of clindamycin and metronidazole on the intestinal colonization and translocation of enterococci in mice. Antimicro Agents Chemother 32: 1769-1775.

- **Woody BJ, Hoskins JD. 1991.** Ehrlichial diseases of dogs. Vet Clin North Am. Small Anim Pract 21:75-98.
- **Zhang X, Zhang J, Long SW, Ruble RP, Yu XJ. 2003.** Experimental *Ehrlichia chaffeensis* infection in beagles. Journal of Medical Microbiology 52:1021-1026.
- **Zhang JZ, Sinha M, Luxon BA, Yu XJ. 2004.** Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: a novel modulation of immune response and host cell cycles. Infect Immun 72:498-507.

IX. APÉNDICE

APÉNDICE N° 1.- Resultados de Chi cuadrado según sexo.

$$X^2 = \frac{((10 \times 41) - (20 \times 24))^2 \times 95}{34 \times 61 \times 65 \times 30} = 0.115$$

APÉNDICE N° 2.- Resultados de Chi cuadrado según la edad.

$$X^2 = \frac{((24 \times 27) - (4 \times 38))^2 \times 95}{62 \times 33 \times 30 \times 65} = 4.20$$

APÉNDICE N° 3.- Resultados de Chi cuadrado según exposición a garrapatas.

$$X^2 = \frac{((28 \times 23) - (2 \times 42))^2 \times 95}{70 \times 25 \times 65 \times 30} = 8.73$$

APÉNDICE N° 4.- Resultados de Chi cuadrado según contacto con perros.

$$X^2 = \frac{((15 \times 25) - (15 \times 40))^2 \times 95}{55 \times 40 \times 30 \times 65} = 1.12$$

APÉNDICE N° 5.- Distribución etárea de las personas seropositivas a Ehrlichiosis.

RANGO DE EDAD	N° DE PERSONAS SEROPOSITIVAS
0 A 10 AÑOS	1
11 A 20 AÑOS	6
21 A 30 AÑOS	12
31 A 40 AÑOS	5
41 A 50 AÑOS	3
51 A 60 AÑOS	2
90 A 100 AÑOS	1